

Effekte immunmodulatorischer Medikamente auf die myelominduzierte Suppression von NK Zellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung eines Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Olga Maurer, geb. Renz

aus Frunse / Kirgisien

2018

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Marie von Lilienfeld-Toal
2. Gutachter: PD Dr. med. Jacob Nattermann

Tag der Mündlichen Prüfung: 22.06.2018

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Brossart

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. Das angeborene und erworbene Immunsystem	7
1.2. NK Zellen	7
1.2.1. Entwicklung, Charakterisierung und Klassifizierung	7
1.2.2. NK-Zellrezeptoren: Einteilung, Liganden, Aufgaben	10
1.3. Multiples Myelom und Monoklonale Gammopathie Unklarer Signifikanz	13
1.3.1. Definition	13
1.3.2. Epidemiologie des MM und der MGUS	13
1.3.3. Symptomatik und Diagnosestellung	14
1.4. Tumورimmunologie	15
1.5. Immunmodulatorische Medikamente (IMiDs) und Bortezomib in der Therapie des MM.....	17
1.5.1. Thalidomid.....	17
1.5.2. Lenalidomid	18
1.5.3. Bortezomib	20
1.6. Ziele der Arbeit.....	21
2. Material und Methoden	22
2.1. Material	22
2.1.1. Zellen.....	22
2.1.2. Geräte	22
2.1.3. Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.4. Zellkultur	24
2.1.5. Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	25
2.1.6. Reagenzien, Puffer	26
2.2. Methoden.....	26
2.2.1. Zellkultur mit RPMI-8226 und Isolierung der PBMC	26
2.2.2. Behandlung mit Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib	27
2.2.3. Bestimmung der Lebendzellzahl	27
2.2.4. Extrazelluläre Antikörperfärbung	28
2.2.5. Intrazelluläre Zytokinfärbung (IFN-gamma APC)	28

2.2.6.	Durchflusszytometrie	29
2.2.7.	Identifizierung der NK Zellen	30
2.2.8.	Mathematisch-statistische Methoden	32
3.	Ergebnisse	33
3.1.	Einfluss von Myelomzellen auf NK Zellen	33
3.1.1.	Anzahl der NK Zellen und ihrer Subpopulationen.....	33
3.1.2.	NK-Zellrezeptoren	35
3.1.3.	Veränderung der IFN-gamma Produktion unter dem Einfluss der Interleukine und der Myelomzellen	39
3.2.	Einfluss von Medikamenten auf die NK Zellen	42
3.2.1.	Anzahl der NK Zellen und ihrer Subpopulationen.....	42
3.2.2.	NK-Zellrezeptoren	44
3.2.3.	Medikamenteneinfluss auf die IFN-gamma Produktion der NK Zellen	49
3.3.	Einfluss von IMiDs und Bortezomib in Anwesenheit von Myelomzellen	50
3.3.1.	Anzahl der NK Zellen und ihrer Subpopulationen.....	50
3.3.2.	NK-Zellrezeptoren	51
3.3.3.	Medikamenteneinfluss auf die IFN-gamma Produktion der NK Zellen in Cokultur mit Myelomzellen	55
4.	Diskussion.....	57
4.1.	Einfluss der Myelomzellen auf die NK Zellen, NK-Zellrezeptoren und IFN-gamma Produktion	58
4.2.	Medikamentenwirkung	61
4.2.1.	IMiDs Thalidomid und Lenalidomid.....	61
4.2.2.	Bortezomib	64
5.	Zusammenfassung	67
6.	Literaturverzeichnis.....	69
7.	Anhang	80
8.	Abbildungsverzeichnis	100
9.	Tabellenverzeichnis.....	105
10.	Danksagung	106

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (antibody dependent cellular cytotoxicity)
APC	Antigen präsentierende Zelle (antigen presenting cell)
BAT3	HLA-B-associated transkript 3
BMSC	Knochenmark Stroma-Zelle (bone marrow stromal cell)
CD	cluster of differentiation
DC	Dendritische Zelle (dendritic cell)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii
FasL	Fas Ligand
FGF2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (fibroblast growth factor 2)
gMFI	geometrische mittlere Fluoreszenzintensität (geometric mean fluorescence intensity)
HCC	Hepatozelluläres Karzinom (hepatocellular carcinoma)
HDCT	Hochdosischemotherapie
HLA	humanes Leukozytenantigen
IFN-gamma	Interferon-gamma
IL	Interleukin
IMiDs	Immunmodulatorische Medikamente (immunomodulatory drugs)
ISS	International Staging System
KIR	Killerzellen-immunglobulinähnliche-Rezeptoren
KLR	Killerzellen-lektinähnliche-Rezeptoren
KM	Knochenmark
MALT	mukosaassoziiertes lymphatisches Gewebe (mucosa associated lymphatic tissue)
MB	MACS Buffer
MICA	MHC Klasse I verwandtes Protein A
MICB	MHC Klasse I verwandtes Protein B
MDSC	Myeloide Suppressorzelle (myeloid derived suppressor cell)
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MLL5	mixed lineage leukemia protein 5

MM	Multiples Myelom
NK Zellen	Natürliche Killerzellen
NCR	natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren (natural cytotoxicity receptors)
pB	peripheres Blut
PBMC	mononukleäre Zelle des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cell)
PTLD	Post-transplant lymphoproliferative disorder
RT	Raumtemperatur
SCT	Stammzelltransplantation (stem cell transplantation)
SMM	Smoldering Multiple Myeloma
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor beta (transforming growth factor beta)
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAIL	Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)
Tregs	regulatorische T Zellen
ULBP	UL 16 bindendes Protein
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)

1. Einleitung

1.1. Das angeborene und erworbene Immunsystem

Täglich trifft der menschliche Organismus auf eine Vielzahl von potentiell pathogenen Mikroorganismen, welche jedoch verhältnismäßig selten eine Infektion verursachen, da die meisten von ihnen bereits innerhalb kürzester Zeit von Abwehrmechanismen des Immunsystems erkannt und eliminiert werden. Man unterscheidet grundsätzlich zwischen der angeborenen, unspezifischen und der erworbenen, antigenspezifischen Immunität.

Die erworbene, antigenspezifische Immunität wird von Lymphozyten vermittelt und kann im Gegensatz zur angeborenen Abwehr einen spezifischen Krankheitserreger erkennen, diesen effizient durch Produktion spezifischer Antikörper eliminieren sowie einen verbesserten Schutz vor erneuter Infektion entwickeln (Delves und Roitt, 2000).

Das angeborene System der Immunabwehr besteht aus mehreren Komponenten. Es gibt einerseits die zellulären Bestandteile wie z.B. die Epithelzellen, die Gewebsmakrophagen, die dendritischen Zellen (DC), die natürlichen Killer-Zellen (NK Zellen) und einige mehr (Delves und Roitt, 2000). Andererseits gibt es die humoralen Elemente, wie z.B. das Komplementsystem, Zytokine und Interferone. Grundsätzlich lässt sich festhalten, dass die angeborenen Abwehrsysteme auf unveränderlichen Rezeptoren beruhen und die allgemein vorkommenden Merkmale von pathogenen Organismen erkennen können (Delves und Roitt, 2000).

Als ein Teil des angeborenen Immunsystems spielen die NK Zellen auch bei der Bekämpfung von Tumorzellen eine wichtige Rolle und werden in folgenden Kapiteln genauer erläutert.

1.2. NK Zellen

1.2.1. Entwicklung, Charakterisierung und Klassifizierung

Die natürlichen Killerzellen wurden nach ihrer Fähigkeit benannt, verschiedene Tumorzellen, bakterien- und v.a. virus-infizierte Zellen durch Ausschüttung von zytotoxischen Granula ohne vorherige Immunisierung zu vernichten (Delves und Roitt, 2000). Die Entwicklung der NK Zellen vollzieht sich aus der lymphatischen Vorläuferzelle im Knochenmark (KM). Morphologisch sind die reifen NK Zellen größer als die B- und T-Lymphozyten, und sie enthalten gut erkennbare zytoplasmatische Granula, welche an der

Oberfläche der Zielzelle freigesetzt werden, die Zellmembran mit Hilfe von Perforin durchdringen und die Apoptose auslösen (Delves und Roitt, 2000).

Im peripheren Blut beträgt der Anteil der NK Zellen von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) ca. 10 – 15 %. Die NK Zellen lassen sich phänotypisch mittels Positivität für Oberflächenmarker CD56 (cluster of differentiation) und Negativität für CD3 von den übrigen Lymphozyten abgrenzen. Mit zunehmender Nutzung monoklonaler Antikörper konnte man die NK Zellen in zwei Subpopulationen nach der Dichte des CD56-Rezeptors unterteilen, und zwar in die kleinere CD56brightCD16dim- (ca. 5 % der NK Zellen im peripheren Blut (pB)) und in die größere CD56dimCD16bright-Population (ca. 95 % der NK Zellen im pB) (Cooper et al., 2001).

CD56bright NK Zellen haben eine reduzierte Anzahl an CD16-Rezeptoren und befinden sich größtenteils in Lymphknoten und im mucosaassoziierten lymphatischen Gewebe (MALT). Die CD56dim-Population exprimiert stark CD16 und kommt hauptsächlich im KM, in der Milz und im Blut vor (Caligiuri, 2008; Fehniger et al., 2003). Diese Subgruppen unterscheiden sich nicht nur im Oberflächenprofil, sondern auch in Bezug auf die Zytotoxizität und Zytokinproduktion. Die CD56bright-Population ist weniger reif als die CD56dim-Population und befindet sich in einem Übergangsstadium von unreifen, agranulierten Zellen zu reiferen, granulierten Zellen, da sich innerhalb der CD56bright-Population sowohl agranulierte als auch granulierten NK Zellen befinden (Lanier et al., 1986). Eine Vorläuferpopulation CD34+CD45RA+ pre-NK Zellen konnte in hoher Prozentzahl im sekundären lymphatischen Gewebe, dagegen aber in niedriger Konzentration im KM und Blut lokalisiert werden. Die hohe Anzahl der CD56bright NK Zellen und der CD34+CD45RA+ pre-NK Zellen, selektiv angereichert an Orten mit vielen DCs oder anderen antigenpräsentierenden Zellen (APCs), die ihrerseits in hoher Zahl membrangebundenes Interleukin (IL) 15 exprimieren und für die NK-Zellreifung von entscheidender Bedeutung sind, legt die Vermutung nahe, dass die NK-Zellentwicklung sich v.a. im sekundären lymphatischen Gewebe vollzieht (Caligiuri, 2008). Der Prozess der NK-Zelldifferenzierung zur CD56dim NK Zelle scheint unidirektional zu sein (Moretta, 2010). Einige Untersuchungen zeigten, dass die reife CD56dim-Population v.a. zytotoxische Eigenschaften hat (Lanier et al., 1986), während die unreife CD56bright-Population eine hohe Zytokinproduktion aufbringen kann und somit monozyten-aktivierend wirkt, dagegen aber eine niedrige natürliche Zytotoxizität vorweist (Caligiuri, 2008).

In neueren Studien konnte zudem gezeigt werden, dass auch ein gewisser Teil der reifen CD56dim-Population (CD56dimCD62L+) eine große Quelle an Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen darstellt und diese sehr schnell, innerhalb von Stunden nach Kontakt mit der Zielzelle, produziert und freigesetzt werden können (Fauriat et al., 2010; Juelke et al., 2010). Ferner regulieren die unreifen CD56bright Zellen die Reifungsprozesse von DCs, und sie können mit Hilfe von Nkp30-Rezeptoren unreife oder aberrante DCs töten. Die CD56bright-Population zeigt die Eigenschaften eines Bindeglieds zwischen der angeborenen und erworbenen Immunabwehr zum einen durch ihre Fähigkeit, Interferon-gamma (IFN-gamma) zu produzieren, und zum anderen durch die enge Lokalisation zu den APCs und T Zellen im sekundären lymphatischen Gewebe (Caligiuri, 2008; Fehniger et al., 2003).

Eine Stimulation der unreifen CD56bright Zellen durch IL 2 und IL 12, freigesetzt von aktivierten T Zellen, Monozyten und DCs, führt zur Produktion von hohen Mengen an IFN-gamma. Dies hat eine Aktivierung von APCs zur Folge. Aktivierte APCs können ihrerseits Major Histocompatibility Complex I (MHC-I)-Moleküle hochregulieren und vermehrt Zytokine sezernieren. Gleichzeitig erfolgt durch die aktivierten APCs auch die Sekretion von Transforming Growth Factor β (TGF- β) und IL 10, welche die IFN-gamma Produktion durch die NK Zellen steuern und ggf. auch eindämmen können (Caligiuri, 2008).

CD56dim Zellen tragen an ihrer Oberfläche Rezeptoren für Immunglobuline und können wiederum über die Bindung an den konstanten Teil des Immunglobulins antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC), z.B. gegen Tumorzellen, ausführen, wenn dieser an der Zielzelloberfläche gebunden ist (Caligiuri, 2008). Des Weiteren zeigt die Reaktion auf IL 2 in den beiden Subpopulationen einen deutlichen Unterschied, der auf dem Vorhandensein von unterschiedlichen IL 2-Rezeptorisoformen, den high affinity und intermediate affinity IL 2-Rezeptoren, beruht. Während die CD56bright-Population beide Rezeptortypen besitzt und unter IL 2 Stimulation deutlich proliferiert, zeigt die CD56dim-Population, die nur intermediate affinity IL 2-Rezeptoren besitzt, auch unter Hinzunahme zusätzlicher anderer Stimuli im Vergleich zur CD56bright-Population eine deutlich niedrigere Proliferationsrate (Baume et al., 1992; Caligiuri et al., 1990). Weitere Unterschiede zwischen den beiden Populationen bezüglich der NKG2A und Killerzellen-immunglobulinähnlichen-Rezeptoren (KIR)-Expression werden weiter unten aufgeführt.

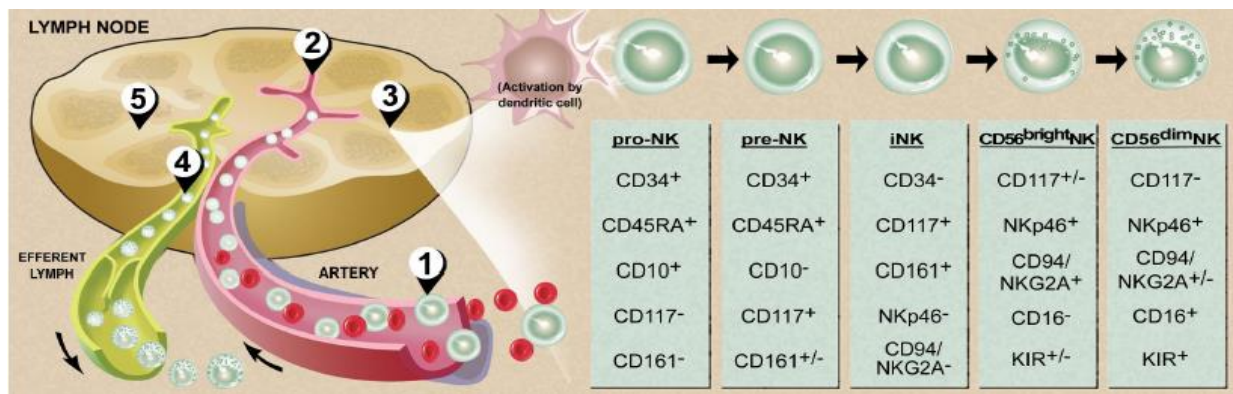


Abb. 1: Modell der NK Zellentwicklung. (1) KM-entstandene CD34CD45RA⁺ zirkulieren im Blut und (2) extravasal im LK in den parafollikulären Raum. Dort (3) werden pro-NK Zellen zur Reifung über verschiedene Stadien aktiviert, bis CD56^{bright} und CD56^{dim} NK Zellen entstehen. Die reifen CD56^{dim} NK Zellen kehren in den Blutkreislauf über Vas efferent zurück (4), während viele der CD56^{bright} Zellen im sekundären lymphatischen Gewebe verbleiben, um mit den DCs zu interagieren (5). Illustration von Debra T. Darte, übernommen von Caligiuri (2008).

1.2.2. NK-Zellrezeptoren: Einteilung, Liganden, Aufgaben

Die Funktion der NK Zellen wird im Gegensatz zu den T Zellen über unveränderliche Rezeptoren reguliert, welche die Komponenten der Oberfläche von den Zielzellen erkennen (Caligiuri, 2008; Hudspeth et al., 2013). Es gibt zwei unterschiedliche Wege, über die eine Zielzellerkennung ablaufen kann: über die NK-Zellrezeptoren oder über die Immunglobulin-Rezeptoren auf den NK Zellen.

Die aktivitätsregulierenden NK-Zellrezeptoren können in drei Gruppen unterteilt werden, welche jeweils sowohl inhibitorische als auch aktivierende Rezeptoren enthalten (Hudspeth et al., 2013). Dazu zählen zum einen Rezeptoren, die zu den C-Typ-Lektinen homolog sind und daher als Killerzellen-lektinähnliche Rezeptoren (KLR) bezeichnet werden. Die andere Gruppe beinhaltet Rezeptoren mit immunglobulinähnlichen Domänen und wird daher als Killerzellen-immunglobulinähnliche-Rezeptoren (KIR) bezeichnet. Die dritte Gruppe besteht aus den natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (NCR) (Caligiuri, 2008; Hudspeth et al., 2013). Die Funktion der KIR und KLR besteht hauptsächlich darin, die Stärke der MHC-Klasse-I-Expression zu erkennen und Zellen mit veränderten oder verminderten MHC-Klasse-I-Proteinen zu zerstören (Caligiuri, 2008).

Grundsätzlich können die NK-Zellrezeptoren in zwei funktionelle Gruppen eingeordnet werden. Die eine Gruppe beinhaltet aktivierende NK-Zellrezeptoren, welche durch die NK-Zellaktivierung zur Freisetzung von zytotoxischen Granula an der Zielzelle mit anschließender Apoptose führen. Die andere Gruppe beinhaltet inhibitorische Rezeptoren,

die eine Aktivierung der NK Zellen hemmen und verhindern, dass normale Körperzellen durch NK Zellen abgetötet werden. Die meisten Signale, die von den NK Zellen empfangen werden, sind inhibitorischer Natur und entstehen durch die Interaktion von NK-Zellrezeptoren, insbesondere KIR und CD94/NKG2A, und einer ausreichenden Anzahl der MHC-I-Moleküle auf körpereigenen Zellen (Caligiuri, 2008). Im Falle einer reduzierten Anzahl der MHC-I-Moleküle werden die NK Zellen nicht mehr ausreichend gehemmt und es kommt zur NK-Zellaktivierung. Die Konsequenz daraus ist die Zytolyse der betroffenen Zellen mit reduzierter Anzahl der MHC-I-Moleküle durch die NK Zellen (Caligiuri, 2008; Delves und Roitt, 2000). Dieser Vorgang der Zytolyse durch die NK Zellen bei Zellen mit reduzierter Anzahl der MHC-I-Moleküle wird als Missing-self-Hypothese bezeichnet (Caligiuri, 2008; Li und Mariuzza, 2014). Für die Erkennung der Zielzellen und Zellyse durch die NK Zellen bedarf es simultaner NK-Zellaktivierung über aktivierende Rezeptoren und Inhibitionsverlust der hemmenden Rezeptoren (Caligiuri, 2008). Die Aktivität der NK Zellen gegen infizierte Zellen oder Tumorzellen wird durch Interferone und Zytokine deutlich verstärkt.

KLR

Die KLR stellen bei dem Menschen ein Heterodimer aus zwei C-Typ-Lektinen CD94 und NKG2 dar, welches mit polymorphen MHC-Klasse-I-Molekülen interagiert. Die NKG2-Familie umfasst sieben Proteine: NKG2A, -B, -C, -D, -E, -F und -H. Davon sind NKG2A und NKG2B inhibitorisch, NKG2C und NKG2D gehören zu den aktivierenden Rezeptoren. NKG2A-Rezeptor ist einer der bekanntesten inhibitorischen Rezeptoren der NK Zellen und wird von einem großen Teil der NK Zellen exprimiert (Moretta et al., 1997). Des Weiteren ist bekannt, dass die Mehrheit der unreifen CD56bright-Population NKG2A-Expression aufweist (Caligiuri, 2008). Der Ligand für NKG2A ist ein nicht klassisches MHC-Klasse-Ib-Molekül, humanes Leukozytenantigen-E (HLA-E) (Caligiuri, 2008).

Der NKG2D-Rezeptor gehört ebenfalls zu der Familie der KLR, bildet ein Homodimer und kommt auf der Zelloberfläche der NK Zellen und der zytotoxischen T Zellen vor. Dieser Rezeptor zählt zu einem der wichtigsten Rezeptoren bei der Erkennung von Tumorzellen oder infizierten Zellen und er erkennt mindestens sechs Liganden, von denen alle mit den MHC-Klasse-I-Molekülen verwandt sind. Drei davon sind Transmembranproteine, die MHC-Klasse-I-ähnlichen MIC-Moleküle MICA, MICB und UL16 bindendes Protein 4 (ULBP4) (Caligiuri, 2008). Diese werden von manchen Tumorzellen, infizierten oder auch

gestressten Zellen exprimiert und können durch zellulären oder metabolischen Stress oder auch fehlerhafte DNA-Replikation induziert werden (Bryceson et al., 2006). Die anderen drei gehören zu den Glycophosphatidylinositol (GPI)-verankerten Proteinen (ULBP1-3) (Cosman et al., 2001).

KIR und NCR

Die sehr polymorphe KIR-Familie umfasst Rezeptoren mit immunglobulinähnlichen Domänen und enthält sowohl aktivierende als auch inhibierende Rezeptoren (Campbell und Purdy, 2010; Li und Mariuzza, 2014). Auf der CD56dim-Population zeigt sich eine recht hohe KIR-Expression, während die CD56bright-Population kaum KIR aufweist oder komplett KIR-negativ ist (Cooper et al., 2001). KIR erkennen und binden an HLA-A, -B und -C-Moleküle (Campbell und Purdy, 2010).

Die NCR NKp30, NKp44 und NKp46 gehören zu den wichtigsten aktivierenden Rezeptoren. In mehreren Studien mit crystallographischen Untersuchungen der NCRs zeigte sich, dass der Aufbau der drei NCRs unterschiedlich ist, obwohl sie sich in ihrer Funktion und in ihrem Aktivitätsspektrum sehr ähneln (Hudspeth et al., 2013). Während NKp30 und NKp46 sich auf den meisten NK Zellen im peripheren Blut wiederfinden, befindet sich der NKp44-Rezeptor nur auf aktivierten NK Zellen (Bryceson et al., 2006; Vitale et al., 1998). Zu den wichtigsten Aufgaben der NCRs gehört die Eliminierung von maligne transformierten sowie von infizierten Zellen. Die Stärke der zytotoxischen Reaktion gegen die transformierten oder infizierten Zellen hängt zum einen von der Anzahl der exprimierten NCRs auf den NK Zellen ab (Sivori et al., 1997) und zum anderen von der Anzahl der NCR-Liganden auf den Zielzellen (Halfteck et al., 2009). In letzter Zeit wurden einige NCR-Liganden entdeckt, welche nicht von pathogenen Organismen stammen, sondern von Tumor- oder gestressten Zellen produziert werden. Einer der ersten entdeckten Liganden ist das HLA-B-assoziierte Transkript 3 (BAT3), welches z.B. von gestressten Tumorzellen produziert wird. Die BAT3-Expression führt zur NK-Zellaktivierung über den NKp30-Rezeptor, infolge dessen es zur Zytolyse durch die aktivierte NK Zelle kommt, sowie zur TNF-alpha und IFN-gamma Produktion (Pogge von Strandmann et al., 2007). Erst kürzlich wurde ein weiterer Ligand, mixed-lineage leukemia-5 Protein (MLL5), ein zellulärer Ligand für NKp44, entdeckt. MLL5 findet sich auf transformierten Zellen sowie Tumorzellen wieder (Baychelier, 2013). Noch einige andere Liganden wie z.B. B7-H6 oder Heparan Sulfat Proteoglycan, die auf Tumorzellen vorkommen, führen ebenfalls

zur NK-Zell-vermittelten Lyse über die NCRs (Brandt et al., 2009; Zilka et al., 2005).

Eine andere, wichtige Funktion der NCRs besteht in der Regulierung der Homeostase der Immunantwort, außerdem spielen sie eine entscheidende Rolle im Reifungsprozess der DCs (Hudspeth et al., 2013). Die Interaktion zwischen den DCs und den NK Zellen beruht zu einem wesentlichen Teil auf NKp30, denn dieser Rezeptor ist in der Lage, unreife oder aberrante DCs zu erkennen und sie der Apoptose zu unterziehen, unter Aussparung von intakten DCs (Caligiuri 2008; Hudspeth et al., 2013). Weitere Studien zeigen, dass die NCRs auch an der Produktion der proinflammatorischen Zytokine, wie z.B. IFN-gamma, beteiligt sind (Caligiuri, 2008).

1.3. Multiples Myelom und Monoklonale Gammopathie Unklarer Signifikanz

1.3.1. Definition

Das Multiple Myelom (MM) ist eine maligne monoklonale Plasmazellerkrankung, die von den B Zellen im KM ausgeht. Gemäß der WHO-Definition zählt das MM zu den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) terminal differenzierter B Zellen (Plasmazellen) (Harris et al., 1999) und betrifft ca. 10 % aller hämatologischen Malignome (Kyle und Rajkumar, 2008).

Typisch bei dieser Erkrankung ist der Knochenmarkbefall durch die malignen Plasmazellen mit daraus resultierender Anämie, Osteolysen bzw. pathologischen Frakturen, Hyperkalziämie, sowie die Bildung monoklonaler Immunglobuline, die auch als Paraproteine bezeichnet werden. Bei der Ausscheidung der Paraproteine im Urin kommt es zu einem unphysiologisch hohen Eiweißgehalt im Urin; dieses Phänomen wird nach einem der Erstbeschreiber als Bence-Jones-Proteinurie bezeichnet (Kyle et al., 2000).

Dem MM geht eine asymptomatische, nicht maligne Plasmazellproliferation voraus, die auch als Monoklonale Gammopathie Unklarer Signifikanz (MGUS) bezeichnet wird (Landgren et al., 2009). Der Begriff MGUS wurde 1978 von Kyle definiert und setzt eine Paraproteinämie von < 30 g/l sowie eine Plasmazellinfiltration des KM < 10 % voraus (International Myeloma Working Group, 2003; Kyle et al., 1978).

1.3.2. Epidemiologie des MM und der MGUS

Die altersadaptierte jährliche Inzidenz des MM liegt bei Menschen heller Hautfarbe heutzutage bei ca. 4 von 100.000 Personen (Kyle und Rajkumar, 2008), wobei es nach

dem 60. Lebensjahr zu einem starken Anstieg der Inzidenz auf ca. 8 Fälle pro 100.000 Personen pro Jahr kommt. Bei Menschen dunkler Hautfarbe ist die altersadaptierte Inzidenz des MM mit 9,5 pro 100.000 pro Jahr doppelt so hoch (Landgren et al., 2006). MGUS kann bei ca. 2-3 % der Bevölkerung, die älter als 50 Jahre ist, nachgewiesen werden, die Prävalenz steigt mit zunehmendem Alter (Rajkumar et al., 2007). Das Risiko, in ein MM überzugehen, bleibt durchgehend konstant bei ca. 1 % (Kyle et al., 2002).

1.3.3. Symptomatik und Diagnosestellung

Die Symptome des MM können je nach Verlaufsformen und Stadium sehr unterschiedlich sein. Typischerweise präsentieren sich die Patienten mit Symptomen wie Abgeschlagenheit, Knochenschmerzen, erhöhte Infektanfälligkeit und manchmal auch Polydipsie/Polyurie oder Nierenfunktionsstörungen mit Oligurie/Anurie. Üblicherweise werden die myelomassozierten Symptome unter den CRAB-Kriterien (s. Tab. 1) zusammengefasst (International Myeloma Working Group, 2003). Ist die Diagnose des MM gesichert und eines der CRAB-Kriterien erfüllt, besteht die Indikation zur Therapie (Kumar et al., 2009).

Es gibt unterschiedliche Verlaufsformen des MM, so dass die Diagnosestellung sich bisweilen schwierig gestaltet. Grundsätzlich sollte die Diagnosestellung des MM nach den „International Myeloma Working Group Diagnostic Criteria for MGUS, SMM and MM“ erfolgen. In Abhängigkeit davon, ob Endorganschäden vorliegen, unterscheidet man zwischen symptomatischem und asymptomatischem MM (International Myeloma Working Group, 2003).

Tab. 1: Crab-Kriterien

	Myelomassozierte Komplikationen	Definition
C	Erhöhter Serumkalziumspiegel	>0,25 mmol/l oberhalb des oberen Normwertes oder >2,75 mmol/l
R	Niereninsuffizienz	Kreatinin i.S. >2 mg/dl
A	Anämie	Hämoglobin-Wert 2 g/dl unterhalb des unteren Normwertes oder <10 g/dl
B	Knochenläsionen	Osteolysen oder Osteoporose mit Kompressionsfrakturen
	Infektneigung	>2 Episoden in 12 Monaten
	Amyloidose	
	Symptomatische Hyperviskosität	

1.4. Tumorimmunologie

Die bisher bekannten genetischen Abberationen beim MM, die oftmals auch bei MGUS schon vorhanden sind (Hallek et al., 1998), können die Tumorausbreitung und den Tumorprogress zum MM allein nicht ausreichend erklären (Bernal et al., 2009). Obwohl die genauen molekularen Prozesse in der Progression von MGUS zum MM oder sekundär zur Plasmazellleukämie (PCL) nicht abschließend untersucht und verstanden sind, häufen sich die Hinweise, dass es Tumorescapemechanismen gibt, die zum Progress der Erkrankung beitragen. Eine Studie konnte zeigen, dass die MM-Zelllyse zum großen Teil NK-Zell-vermittelt stattfindet. In einer Cokultur aus MM-Zelllinien und PBMC wurden CD56 positive Zellen depletiert. Dies resultierte in einer signifikanten Reduktion der MM-Zelllyse in beiden Zelllinien (Davies et al., 2001). Im Gegensatz zu T Zellen sind NK Zellen in der Lage, Tumorzellen ohne vorherige Sensibilisierung zu erkennen und zu eliminieren (Robertson und Ritz, 1990). Dies geschieht z.B. über veränderte, verminderte oder gar fehlende Expression von MHC Klasse I Antigenen auf vielen der Tumorzellen. Dass viele Tumorzellen unterschiedliche Tumorescapemechanismen entwickelt haben, um der Immunüberwachung zu entgehen, zeigt eine Studie, die bei den malignen Plasmazellen aus dem KM von MGUS-, MM-Patienten und einem Patienten mit Plasmazellleukämie (PCL) eine vermehrte Expression der MHC-I-Klasse Moleküle nachweisen konnte, wobei die höchste Expression auf den MM-Plasmazellen zu finden war, gefolgt von MGUS-Plasmazellen. Im Vergleich dazu hatte die Kontrollgruppe eine normal niedrige MHC-I-Expression. Die Studie untersuchte außerdem auch das MHC Klasse I verwandte Protein A- (MICA) und die Fas-Expression¹. MICA, welches zu den NKG2D-Liganden zählt und über die Bindung an den NKG2D-Rezeptor die NK Zellen aktiviert und zur NK-vermittelten Zelllyse führt, zeigte bei den nicht malignen Plasmazellen der Kontrollgruppe die höchste und bei den Plasmazellen von den Patienten mit MM stadienabhängig die niedrigste Expression. Bei dem Patienten mit PCL waren die Plasmazellen komplett MICA negativ. Somit wurden die Myelomzellen v.a. in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien durch die NK Zellen nicht suffizient erkannt und eliminiert (Bernal et al., 2009). Passend zur

¹ Fas ist ein Oberflächenrezeptor auf unterschiedlichen Zellen, welcher nach Bindung an den Fas-Liganden (FasL) proapoptotische Faktoren induziert und folglich die Apoptose einleitet (Peter et al., 2015).

Verminderung der MICA/B und ULBP-Expression gibt es Annahmen, dass Tumorzellen die Expression der NKG2D-Liganden über die Ausschüttung von löslichen NKG2D-Liganden (MIC und ULBP) vermindern, die NKG2D-Expression auf NK und T Zellen reduzieren und die Rezeptoren direkt blockieren können, wodurch die Lyse von Tumorzellen beeinträchtigt wird (Groh et al., 2002; Waldhauer und Steinle, 2006). Die Verminderung der NKG2D-Expression auf den NK Zellen erfolgt vermutlich nicht über die löslichen NKG2D-Liganden, sondern durch einen direkten Kontakt der Myelomzellen mit NK Zellen (von Lilienfeld-Toal et al., 2010). Die NKG2D-MIC/ULBP Bindung induziert die Expression des Fas-Liganden (FasL) bei T Zellen und NK Zellen. Dieser Mechanismus stellt wiederum einen der wichtigsten und potentesten Auslöser der Apoptose durch die NK Zellen oder durch zytotoxische T Zellen dar (Ebert und Groh, 2008). Einige Arbeiten zeigten bei Patienten mit MGUS und insbesondere mit MM eine graduelle Verminderung der Fas-Expression sowie ein komplettes Fehlen des Fas-Rezeptors auf den Plasmazellen bei Patienten mit PCL (Bernal et al., 2009). Wiederum andere Forschungsgruppen konnten auf Myelomzellen die Expression sowohl von Fas als auch von FasL nachweisen, so dass die NK und T Zellen an die FasL der Myelomzellen binden und der Apoptose unterliegen, bevor sie die Myelomzellen angreifen können (Villunger et al., 1997). Eine Fas-getriggerte, z.B. auch gegenseitige Apoptose der Myelomzellen, die Fas und FasL exprimieren, findet aufgrund einer intrinsischen Resistenz nicht statt (Cook und Campbell; 1999).

Über Sekretion unterschiedlicher Zytokine und Wachstumsfaktoren (IL 10, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)), unter anderem auch durch die Myelomzellen selbst, wird die natürliche Tumormunität beeinträchtigt. Beispielsweise wirkt IL 10 zum einen hemmend auf die Monozyten/Makrophagen und beeinträchtigt zudem die T-Zell-Effektorfunktionen. Dadurch wird die Synthese proinflammatorischer Zytokine inhibiert. Zum anderen dient es als Wachstumsfaktor für maligne plasmoblastische Zelllinien (Lu et al., 1995). VEGF ist ein Wachstumsfaktor für Endothelzellen und spielt eine wichtige Rolle bei der Neovaskularisation der Tumoren. Es ist aber auch für eine defekte Reifung der DCs verantwortlich (Cook und Campbell, 1999). Myelomzellen können über VEGF die Stromazellen des KM zur IL 6 Produktion anregen, welches wiederum als Wachstums- und Differenzierungsfaktor für die Myelomzellen fungiert und die APCs von der Antigenpräsentation und weiterer Stimulation des Immunsystems abhält (Cook und Campbell, 1999).

1.5. Immunmodulatorische Medikamente (IMiDs) und Bortezomib in der Therapie des MM

Das MM gilt immer noch als eine unheilbare Erkrankung, obwohl sich in den letzten Jahrzehnten infolge rasanter Neuentwicklung oder auch Wiederentdeckung von immunmodulatorischen Substanzen die Lebenserwartung deutlich gebessert hat. Im Folgenden werden die drei Substanzen Thalidomid, Lenalidomid, zusammengefasst als IMiDs, und Bortezomib beschrieben, welche mittlerweile einen festen Bestandteil in der Therapie der Patienten mit einem MM eingenommen haben.

1.5.1. Thalidomid

Thalidomid kam zunächst als ein Sedativum am 01.10.1957 auf den Markt und wurde 1960 auch als Antiemetikum bei der schwangerschaftsassozierten Übelkeit verschrieben. 1961 wurden die ersten Verdachtsmeldungen über möglicherweise schwere teratogene Malformationen bei den Neugeborenen bei Einnahme während der Schwangerschaft geäußert (Rajkumar, 2004). Thalidomid wurde vom Markt genommen und weckte einige Jahrzehnte später großes Interesse in Hinblick auf die Therapie mancher Erkrankungen, u.a. auch des MM (Chang et al., 2014).

Unter Thalidomidtherapie wurden klinische Ansprechraten von 32 % bei MM-Patienten mit refraktärer Erkrankung nach konventioneller und Hochdosischemotherapie (HDCT) beobachtet, so dass es zunächst für das refraktäre MM (Singhal et al., 1999) und 2006 schließlich auch für das neudiagnostizierte MM in Form von Kombinationstherapie zugelassen wurde. Thalidomid verfügt über viele unterschiedliche Eigenschaften, welche u.a. immunmodulatorisch, antiangiogenetisch und apoptotisch sind (Chang et al., 2014; Rajkumar, 2004). Der Mechanismus der immunmodulatorischen Wirkung wird nicht nur durch die Hemmung von TNF-alpha verursacht, sondern läuft auch über die Costimulation der T Zellen ab und induziert T Zell-Proliferation in Anwesenheit von DC's (Chang et al., 2014; Krieg und Ullrich, 2013). So können die durch das Thalidomid stimulierten T Zellen zur IFN-gamma und IL 2 Produktion angeregt werden, was folglich zur NK-Zellaktivierung führt (Davies et al., 2001). Auch ein direkter Effekt auf die NK Zellen konnte durch das Thalidomid und andere IMiDs nachgewiesen werden. Bei *in vitro* mit Thalidomid und Lenalidomid behandelten PBMC ging die anschließende erhöhte Zytotoxizität gegen die Myelomzellen verloren, als die NK Zellen depletiert wurden. Viele Arbeitsgruppen konnten

einen prozentualen NK-Zellanstieg und eine veränderte NK-Zellfunktion unter der Therapie mit IMiDs feststellen (Chang et al., 2014; Davies et al., 2001; Krieg und Ullrich, 2013). Durch die Beeinflussung der Sekretion unterschiedlicher Zytokine wie z.B. IL 10, IL 6, IL 1 β und TNF-alpha kann Thalidomid wichtige immunmodulatorische Wirkungen auf das Immunsystem (Corral et al., 1999) und Myelomzellwachstum ausüben. Da das MM die IL 6 und VEGF-Sekretion im KM triggert, das IL 6 ein wichtiger Wachstums- und Überlebensfaktor für das MM ist und das VEGF vermutlich an der Proliferation und Migration der Myelomzellen beteiligt ist, wirkt Thalidomid dem MM entgegen, indem es eine Hochregulation von IL 6 und VEGF verhindert (Chang et al., 2014; Davies et al., 2001). Die Hemmung der TNF-alpha Produktion resultiert zum einen in einer verminderten Expression der Oberflächenadhäsionsproteine, welche für das Überleben der Myelomzellen von enormer Bedeutung sind, und zum anderen in einer verminderten Produktion und Sekretion von IL 6 (Hideshima et al., 2001).

Eine andere wichtige Wirkung des Thalidomids besteht in der Hemmung der Angiogenese. Dennoch muss erwähnt werden, dass obwohl der antiangiogenetischer Effekt sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen werden konnte, die Antitumoreffekte von Thalidomid nicht immer mit der Stärke der Angiogenesehemmung korrelierten (Strasser und Ludwig, 2002). Andere Arbeiten konnten wiederum als einen der Antitumoreffekte oxidativen Stress oder direkte Induktion der Apoptose über die gesteigerte Expression von unterschiedlichen proapoptotischen Faktoren auf den Tumorzellen identifizieren (Chang et al., 2014). Zum Teil sind diese Effekte nur bei relativ hohen Thalidomid-Konzentrationen zu beobachten, welche im Plasma durch die übliche Dosierung nicht erreicht werden können. Aufgrund des Nebenwirkungsprofils wurden sicherere und potentere Thalidomidanaloga, z.B. das Lenalidomid, entwickelt (Chang et al., 2014).

1.5.2. Lenalidomid

Das Thalidomidanalogon Lenalidomid ist in Europa seit 2007 zur Behandlung des rezidierten/refraktären MM nach mindestens einer vorausgegangenen Therapie in Kombination mit Dexamethason zugelassen. Lenalidomid ist deutlich potenter im Vergleich zu Thalidomid bezogen auf die TNF-alpha Hemmung und es zeigt zugleich deutlich weniger neurotoxische Nebenwirkungen (Chang et al., 2014; Sharma et al., 2006). Lenalidomid scheint sehr vielfältig zu sein und unterschiedliche Wirkungen auf T Zellen

und NK Zellen zu haben. Ähnlich wie das Thalidomid stimuliert auch das Lenalidomid die T Zellen, die dann vermehrt IL 2 und IFN-gamma sezernieren. Dies wiederum führt zur NK-Zellaktivierung (Davies et al., 2001). Bei den aktivierten NK Zellen selbst konnte jedoch eine Hemmung der IFN-gamma Produktion unter Lenalidomid nachgewiesen werden, die allerdings die NK-Zellzytotoxizität nicht beeinflusst hat (Dauguet et al., 2010). Einigen Berichten zufolge hemmt das Lenalidomid auch die immunsupprimierende Aktivität und die Akkumulation der myeloid-derived suppressor Zellen (MDSCs) und Tregs (Sakamaki et al., 2014).

Interessanterweise konnte auch unter Lenalidomid eine vermehrte CD56-Expression auf NK Zellen, also eine Verschiebung des Phänotyps zugunsten von unreifen NK Zellen, nachgewiesen werden (Zhu et al., 2008). Da die unreife NK-Zellpopulation wesentlich an der IFN-gamma Produktion und Sekretion beteiligt ist, scheint die Abnahme der IFN-gamma Produktion kontrovers zur Steigerung der unreifen NK-Zellpopulation zu sein. Widersprüchlich zu dieser Beobachtung konnten andere Arbeitsgruppen eine Vermehrung von CD56dim-Population mit anschließender Steigerung der ADCC und MM-Zelllyse feststellen (Dauguet et al., 2010; Tai et al., 2005). Neben der Veränderung der CD56-Expression auf NK Zellen scheint Lenalidomid noch andere Veränderungen am Phänotyp der NK Zellen zu bewirken. Durch einen vermutlich direkten Effekt auf die NK Zellen wird KIR und NKp46 unter Lenalidomid erheblich geringer exprimiert, ohne dass es dabei zu einer wesentlichen Beeinflussung der NK-Zell-vermittelten Lyse kommt (Dauguet et al., 2010). Eine andere Arbeitsgruppe konnte *in vivo* bei MM-Patienten mit Relapse nach allogener Stammzelltransplantation eine signifikante Erhöhung der NKp44 positiven Zellen nach 3-monatiger Therapie mit Lenalidomid feststellen (Lioznov et al., 2010).

Ähnlich wie bei Thalidomid werden auch unter der Lenalidomidwirkung die Oberflächenadhäsionsproteine sowohl auf den Krebszellen als auch auf den BMSCs vermindert exprimiert (Bolzoni et al., 2013), wodurch es zur erheblichen Störung der interzellulären Kontakte kommt, mit konsekutiver Verminderung der Sekretion von wichtigen Wachstumsfaktoren wie z.B. IL 6, IL 1 β und TNF-alpha für die Tumorzellen (Semeraro et al., 2013). Ferner beeinflusst das Lenalidomid das übrige Tumormicroenvironment, indem durch die verminderte TNF-alpha Sekretion auch die Sekretion von anderen Wachstumsfaktoren wie VEGF und Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF2) gehemmt wird (Richardson et al., 2002).

1.5.3. Bortezomib

Bortezomib (PS-341) ist ein reversibler Inhibitor des 26S-Proteasoms (Hideshima et al., 2001) und der erste Proteasom-Inhibitor, der seit 2003 zur Behandlung des therapierefraktären und rezidierten und später auch des neudiagnostizierten MM zugelassen worden ist. Bortezomib blockiert die Funktion des 26S-Proteasoms und verhindert somit den Abbau von fehlerhaften und abnormen Proteinen, insbesondere solcher, die in den Zellzyklus und in Transkriptionsvorgänge involviert sind. Da solche Proteine vor allem während der Karzinogenese reichlich vorhanden sind, führt die Hemmung des Proteasoms zum Zelltod und dient somit als ein wichtiger Ansatzpunkt in der zytoreduktiven Therapie. Grundsätzlich scheinen Proteasom-Inhibitoren viele unterschiedliche Wirkungen auf Tumorzellen auszuüben, u.a. werden die Tumorzellen der NK-Zell-vermittelten Lyse über unterschiedliche Mechanismen zugänglich gemacht (Lundqvist et al., 2006, 2010; Shi et al., 2008). Unter Bortezomib konnte eine erhöhte Expression der NKG2D-Liganden gezeigt werden (Butler et al., 2009; Jardine et al., 2012). Überdies kann Bortezomib auch die MIC-Proteinexpression auf den malignen Zellen erhöhen und diese der NK-Zell-vermittelten Lyse zugänglich machen. Ein anderer Effekt des Bortezomibs besteht darin, HLA Klasse I Moleküle zeit- und dosisabhängig auf MM Zellen *in vitro* und *in vivo* zu vermindern und somit zu deren Erkennung durch die NK Zellen beizutragen (Hallett et al., 2008; Shi et al., 2008). Des Weiteren zeigt Bortezomib auch einen direkten apoptotischen Effekt auf Myelomzellen im KM, reduziert deren Adhäsion zu den BMSC und anderen extrazellulären Matrixproteinen und vermindert sowohl die Transkription als auch die Ausschüttung von bestimmten Zytokinen in das KM-Milieu (Richardson et al., 2003). Auch der IL 6 Rezeptor wird durch das Bortezomib weniger exprimiert (Hideshima et al., 2003a) und somit sowohl vermehrte Zytotoxizität als auch eine Hemmung der DNA-Reparatur bewirkt (Hideshima et al., 2003b).

Trotz der zahlreichen zytoreduktiven Effekte des Bortezomibs auf die Tumorzellen hat man auch einige supprimierende und proapoptotische Mechanismen auf verschiedene Zellen des Immunsystems, u.a. auch NK Zellen, beobachten können. Zum einen kommt es bei Bortezomib behandelten NK Zellen zu einer Verminderung der Expression des NKp46-Rezeptors und folglich auch zur verminderten NKp46-vermittelten NK-Zellaktivität (Wang et al., 2009). Zum anderen konnte auch eine Herabsetzung von Tumornekrosefaktor-verwandtem Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL) auf IL 2 aktivierten NK Zellen

beobachtet werden, was ebenfalls zu einer verminderten NK-Zellzytotoxizität führt (Feng et al., 2010). Auch die IFN-gamma Produktion scheint durch Bortezomib dosisabhängig negativ beeinflusst zu werden (Armenau et al., 2008).

1.6. Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich hauptsächlich mit zwei Themen. Diese fokussierten sich zum einen auf die Immundefekte, die während der Erkrankung mit MM entstehen, und zum anderen auf die Immunmechanismen während der Therapie mit IMiDs und Bortezomib.

Das erste Thema untersuchte die Wirkung der Myelomzelllinie RPMI-8226 auf die NK Zellen, deren reife und unreife Subpopulationen, sowie auf die NK-Zellrezeptoren und die IFN-gamma Produktion.

Das zweite Thema untersuchte einerseits die Effekte der IMiDs und des Bortezomibs auf die NK Zellen, deren reife und unreife Subpopulationen, die NK-Zellrezeptoren und die IFN-gamma Produktion. Andererseits wurde der gleichzeitige Effekt der o.g. Medikamente und der Myelomzelllinie RPMI-8226 auf die NK Zellen, deren Subpopulationen, NK-Zellrezeptoren und die IFN-gamma Produktion untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zellen

Zur Untersuchung der NK Zellen wurden Leukozyten aus Buffy Coats gewonnen und sofort weiterverarbeitet. Für die Versuche mit der Cokultur wurde die Myelomzelllinie RPMI-8226 verwendet.

2.1.2. Geräte

Tab. 2: Geräte

Zentrifuge (Allegra X-15 Centrifuge)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
CO2-Inkubator (Steri-Cult 200 Incubator)	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn, Deutschland
Lichtmikroskop (Olympus CKX41)	Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland
Durchflusszytometer FC 500	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Durchflusszytometer FACS Canto II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Neubauer Zählkammer, Tiefe 0,1 mm	
Tischzentrifuge (Centrifuge 5417R)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sicherheitswerkbank (HERA Safe)	Thermo Fischer Scientific Germany Ltd. &Co. KG, Bonn, Deutschland

2.1.3. Verbrauchsmaterialien

Tab. 3: Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen, steril, mit Filter	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
12-Loch-Gewebekulturplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Gewebekulturflaschen (T75 cm ² Cell Culture Flask)	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn Deutschland
50 ml-Röhrchen (Falcon tubes), PP, steril	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Staining tubes for FACS analysis (micro tubes), #297862150	Labomedic, Bonn, Deutschland
15 ml-Röhrchen, PP, steril	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland

2.1.4. Zellkultur

Tab. 4: Zellkultur

RPMI-8226	Myelomzelllinie, bereitgestellt von M. von Lilienfeld-Toal, UKB, Deutschland
PBMC	Buffy coats
Ficoll (Dichte 1,077)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Zellkulturmedium RPMI 1640 + Glutamax™	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
25 mM HEPES	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
β-Mercaptoethanol 50 µM	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
0,25 % Trypsin-EDTA phenol red	Life Technologies # 25200-056
PBS	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
IL 12	recombinant human IL 12, ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Deutschland
IL 15	recombinant human IL 15, ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Deutschland
IL 2	recombinant human IL 2, ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Deutschland
Lenalidomid	CAS 191732-72-6, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Thalidomid	CAS 50-35-1, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Bortezomib	Apotheke des Universitätsklinikums Tübingen
Mitomycin C	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

2.1.5. Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tab. 5: Antikörper für Durchflusszytometrie

Mäuse anti-human CD56-PC5	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
monoklonales IgG1 (Mouse)-PE	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Mäuse anti-human NKG2A (CD159a)-PE	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Mäuse anti-human NKG2D-PE	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Mäuse anti-human NKp30 (CD337)-PE	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Mäuse anti-human NKp44 (CD336)-PE	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Mäuse anti-human NKp46 (CD335)-PE	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
CD8 APC-Cy7	Clone: SK1 Cat:344714; Lot: B137337
IFN-g APC	eBioscience #17-7319
Hoechst	

2.1.6. Reagenzien, Puffer

Tab. 6: Reagenzien, Puffer

Brefeldin A	eBioscience #00-4506
PFA	4 % Paraformaldehyde in PBS
Perm Buffer	0,2 % Saponin in MACS Buffer
MACS Buffer	1,5 % FCS, 2 mM EDTA in PBS
EDTA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
CT&S Beads	BD Biosciences, San Jose, USA
Zellkulturmedium für PBMC aus buffy coat	RPMI 1640 10 % FCS 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin
Zellkulturmedium für RPMI-8226	RPMI 1640 10 % FCS 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin 12,5 ml 25 mM HEPES 200 µl 50 µM β -Mercaptoethanol

2.2. Methoden

In den folgenden Abschnitten werden die Methoden zur Behandlung und Quantifizierung der NK Zellen, der NK-Zellrezeptoren und der IFN-gamma Sekretion in den verschiedenen Ansätzen erläutert.

2.2.1. Zellkultur mit RPMI-8226 und Isolierung der PBMC

Für alle Versuche mit Cokultur wurde die Myelomzelllinie RPMI-8226 benutzt. Die Zellen wurden in RPMI 1640 mit 1 % Penicillin und Streptomycin, 10 % FCS, 25 mM HEPES und 50 µM β -Mercaptoethanol gehalten. Die PBMC wurden aus den Buffy Coats gesunder Spender mittels Ficoll-Dichtegradienten isoliert und in Kultur mit RPMI 1640 mit 1 % Penicillin und Streptomycin und 10 % FCS genommen. Eine Isolierung der NK Zellen erfolgte nicht. Nach der Isolierung der PBMC wurden diese zusammen mit der

Myelomzelllinie RPMI-8226 in Cokultur in 12-Well-Platten genommen. Vor der Cokultivierung wurde die Myelomzelllinie RPMI-8226 entweder mit Mitomycin (50 µg/ml) für 30 Minuten bei 37 °C behandelt oder mit 100 Gy eine Stunde lang bestrahlt. Nach der Prozedur wurden die Zellen 2-mal mit dem Kulturmedium gewaschen und mit den PBMC in Cokultur genommen. Das Verhältnis der Myelomzellen und der PBMC betrug 1:1 mit einer Zelldichte von 2×10^6 /ml. Bei den Ansätzen ohne die Myelomzellen betrug die Zelldichte auch 2×10^6 /ml. Die Ansätze wurden anschließend sofort mit Interleukinen IL 2 (300 IU/ml), IL 12 (10 ng/ml) und IL 15 (100 ng/ml) beimpft. Die Kultivierung der verwendeten Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Inkubator für 24 Stunden.

2.2.2. Behandlung mit Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib

Unter der Vorstellung, dass es im Rahmen der Erkrankung mit MM und einer zugeführten Therapie eine relevante simultane Beeinflussung der NK Zellen durch die Faktoren Myelomzellen und Medikament gibt, wurden *in vitro* in unterschiedlichen Ansätzen sofort nach der NK-Zellisolierung NK Zellen in Cokultur mit Myelomzellen RPMI-8226 mit jeweils einem der Medikamente Thalidomid (5 µg/ml), Lenalidomid (5 µg/ml) und Bortezomib (2 ng/ml) beimpft und für 24 Stunden in einem Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Um den alleinigen Effekt der Medikamente zu erkunden, wurden gleichzeitig die NK Zellen in Abwesenheit von Myelomzellen mit jeweils Thalidomid (5 µg/ml), Lenalidomid (5 µg/ml) und Bortezomib (2 ng/ml) für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Bei diesen Werten handelt es sich um Konzentrationen, welche leicht im Plasma nach Medikamenteneinnahme erreicht werden, ohne dabei eine zu hohe Zytotoxizität aufzuweisen (Davies et al., 2001; Wang et al., 2009). Es wurde der Einfluss der Medikamente auf die Gesamtpopulation der NK Zellen, die reife und unreife Subpopulation und deren IFN-gamma Produktion sowie auf die NK-Zellrezeptoren (NKG2A, NKG2D, NKp30, NKp44 und NKp46) nach 24 Stunden Inkubation untersucht. Verglichen wurde jeweils die mit einem Medikament und mit Interleukinen behandelte Probe mit der Kontrollgruppe (gleiche Konstellation, jedoch ohne das Medikament).

2.2.3. Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Zellzahl der lebendigen Zellen wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Diese Zählkammer besteht aus vier Quadranten, in welchen die Zellen mikroskopisch ausgezählt werden. Um lebendige Zellen von den toten unterscheiden zu können, wurden

die Zellen mit Trypanblau angefärbt. Trypanblau wird von den apoptotischen Zellen aufgenommen, dadurch erscheinen diese unter dem Mikroskop blau im Gegensatz zu lebendigen Zellen, die weißlich bleiben. Von der gefärbten Zelllösung wurde jeweils 10 µl auf die Neubauer-Zählkammer aufgetragen, wobei jeder große Quadrant ein Volumen von 0,1 mm³ umfasst. Die ausgezählte Zellzahl wurde dann folgendermaßen berechnet und auf die Gesamtzellzahl übertragen:

$$\frac{\text{Lebendzellzahl}}{4} * \text{Verdünnungsfaktor } 10^4$$

2.2.4. Extrazelluläre Antikörperfärbung

Nach 24 Stunden Kulturdauer wurden die Zellen in FACS-Tubes hinein pipettiert und zentrifugiert, bis sich ein Zellpellet gebildet hat. Anschließend wurde der Überstand abdekantiert und die Zellen zusammen mit den jeweiligen extrazellulären Antikörpern für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein Waschgang mit MACS Buffer (MB). Kurz vor der Messung wurde Hoechst in einer Konzentration von 1 µg/ml hinzugefügt, um bei der Messung die apoptotischen Zellen zu kennzeichnen. Danach wurden die Proben am Canto II Durchflusszytometer (BD Biosciences) gemessen.

2.2.5. Intrazelluläre Zytokinfärbung (IFN-gamma APC)

Nach 19 Stunden Kulturdauer wurde Brefeldin A zu den Zellen mit einer Verdünnung von 1:1000 hinzugefügt (d.h. für die letzten 5 Stunden der gesamten Kulturdauer à 24 Stunden) und im Brutschrank 5 Stunden lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in kleine FACS-Tubes pipettiert und zentrifugiert, bis sich ein Zellpellet gebildet hat. Daraufhin wurde der Überstand verworfen und es wurden ca. 50 µl im FACS-Tube belassen. Die Probe wurde mit konjugierten Antikörpern für die extrazelluläre Färbung versetzt, das Zellpellet gut durchmischt und für 15 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von PBS, die Probe wurde zentrifugiert und der Überstand entfernt, 100 µl wurden belassen. Das verbliebene Pellet wurde anschließend resuspendiert, mit 100 µl PFA versetzt und für 20 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Daraufhin erfolgte eine 2-malige Hinzugabe von jeweils 750 µl und 1 ml Perm Buffer. Nach jeder Zugabe wurden die

Zellen pelletiert und der Überstand abdekantiert. Anschließend erfolgte die intrazelluläre Färbung mit 0,625 µl IFN-gamma APC und die Probe wurde für 15 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurde die Probe zweimal mit jeweils 1 ml Perm Buffer versetzt, die Zellen pelletiert und der Überstand verworfen. Schlussendlich wurde die Probe in 200 µl MB aufgenommen und im Kühlschrank bis zum nächsten Tag zur Messung belassen.

2.2.6. Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie basiert auf der Messung von fluoreszenzmarkierten Zellen. Hierbei werden die Zellen nach der Färbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff in einem laminaren Flüssigkeitsstrom der Durchflussskammer zugeführt, welche einen 488 nm Argon-Laser und einen 635 nm Dioden-Laser enthält. Die Detektion erfolgt zum einen Anhand des Streulichts, so dass dadurch eine Aussage über die Größe und die Granularität des gemessenen Partikels möglich wird. Zum anderen wird der sich auf der Oberfläche befindende Fluoreszenzfarbstoff durch den entsprechenden Laser angeregt. Durch die Anregung strahlt dieser ein bestimmtes Emmisionsspektrum mit einem charakteristischen Maximum aus. Dadurch kann eine bestimmte antigene oder auch biochemische Eigenschaft der detektierten Zelle zugeschrieben werden.

In dieser Arbeit wurden durch die räumliche Umstrukturierung der Medizinischen Klinik III der Universitätsklinik Bonn und des entsprechenden Forschungslabors die Messungen an zwei unterschiedlichen FACS-Geräten (Cytomics FC 500 von Beckman Coulter von April 2010 bis 2011 und BD FACSCanto II ab Mai 2011) vorgenommen.

Die Ansätze mit nur extrazellulären Antikörperfärbung wurden am gleichen Tag, die Ansätze mit der extrazellulären und intrazellulären Färbung wurden am Folgetag am Durchflusszytometer nach Gebrauchsanleitung gemessen und die Daten mit der Software FlowJo Version 8.7 (Tree Star) analysiert. Vor jeder Messung erfolgte eine Autokompensation mittels CT&S beads (250 µl FACS-Flow + 15 µl Beads). Als Isotypkontrolle wurde Maus-anti-IgG1 verwendet. Es wurden zum einen die NK-Zellrezeptor-exprimierenden Zellen absolut und in Prozent gemessen. Zum anderen wurde aber auch die Dichte der exprimierten NK-Zellrezeptoren auf der jeweiligen NK Zelle gemessen und als die geometrische mittlere Fluoreszenzintensität (gMFI) dargestellt. Somit konnte nicht nur die prozentuale Veränderung der NK-Zellrezeptor-exprimierenden Zellen festgestellt werden, sondern auch eine Veränderung der Dichte der jeweiligen

Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Aufgrund der unterschiedlichen FACS-Geräte und der verhältnismäßig langen Zeitdauer, in der die Experimente durchgeführt wurden, gestaltete sich die Auswertung der gMFI bei allen durchgeführten Experimenten als problematisch. Daher wurde in dieser Arbeit auf eine systematische Auswertung aller gMFI-Werte verzichtet. Die in dieser Arbeit ausgewerteten, exemplarischen gMFI-Ergebnisse stammen aus den letzten Versuchen, welche am BD FACSCanto II innerhalb eines Monats durchgeführt wurden. Dies resultiert in teilweise unterschiedlichen n-Zahlen bei der gMFI-Auswertung. Die gMFI-Ergebnisse sind als Differenz der gMFI der gefärbten Proben und der gMFI der Isotyp-Kontrolle dargestellt.

2.2.7. Identifizierung der NK Zellen

Zur Identifizierung der lebenden Zellen wurden die PBMC mit Hoechst gefärbt. Dann wurden die Lymphozyten durchflusszytometrisch mittels FSC und SSC abgegrenzt. Zur weiteren Identifizierung der NK Zellen, welche u.a. CD3 negativ und CD56 positiv sind, wurden die gängigen Oberflächenantikörper CD3 und CD56 verwendet. Innerhalb der NK-Zellpopulation konnten zwei Subpopulationen anhand der Ausprägung der CD56-Expression dargestellt werden, die CD56bright- und CD56dim-Population. Die einzelnen Schritte sind in Abbildung 2 dargestellt. Sowohl die gesamte NK-Zellpopulation als auch die unreife CD56bright- und die reife CD56dim-Population wurden bezüglich der NKG2A, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46 und IFN-gamma-Expression analysiert.

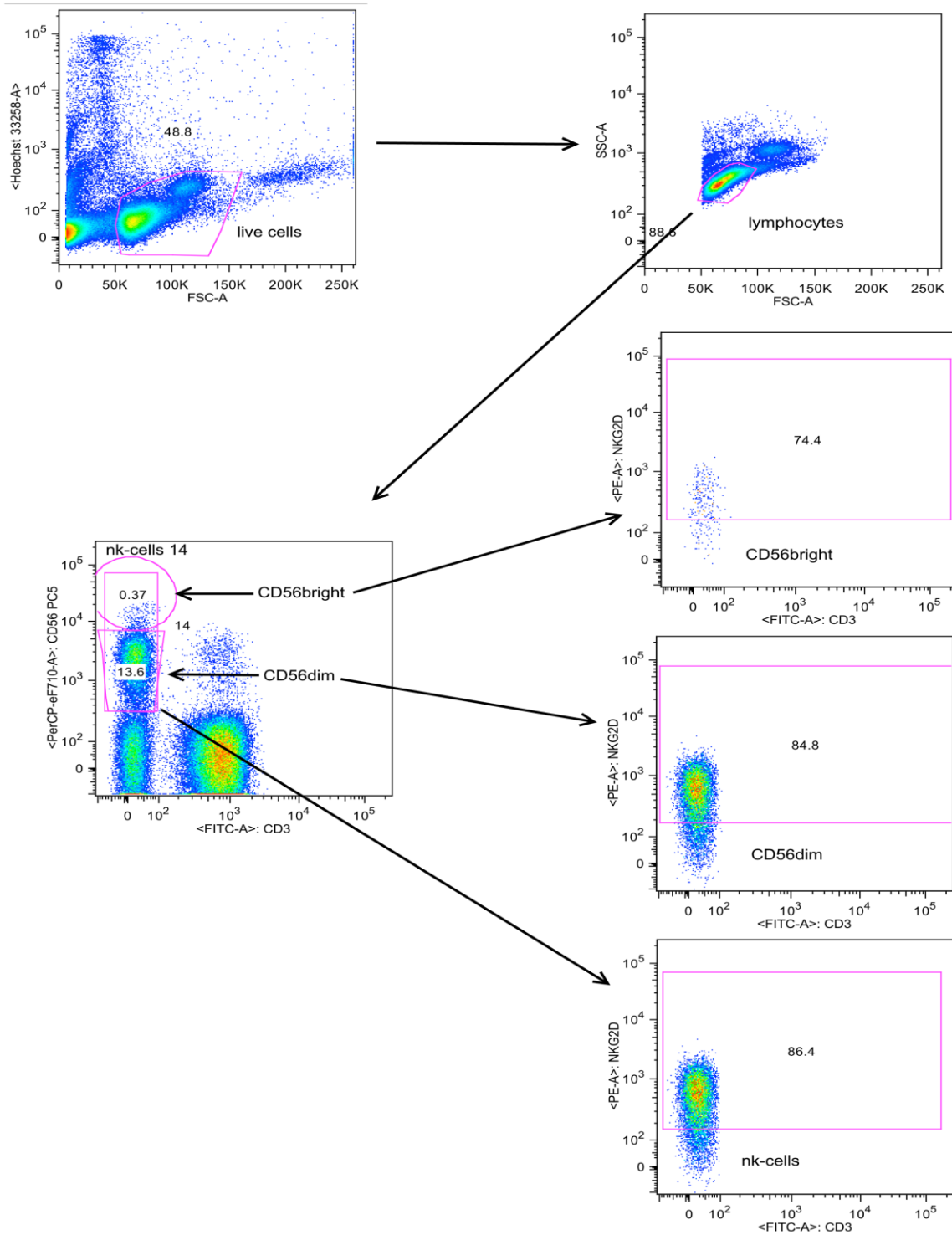


Abb. 2: Durchflusszytometrische Identifizierung der NK Zellen und der Subpopulationen CD56bright und CD56dim über CD56 PC5 und CD3 FITC. Exemplarische Darstellung der NKG2D-positiven Zellen innerhalb der drei Gruppen.

2.2.8. Mathematisch-statistische Methoden

Die statistische Datenanalyse wurde mit Hilfe des Programms GraphPad Prism Version 4.0b und Version 6.0 vorgenommen. Dabei wurden deskriptive Statistiken (Median, Interquartilenbereich) benutzt. Mit Hilfe des zweiseitigen t-Tests für abhängige Stichproben mit gleicher Varianz konnten Mittelwerte, Standardabweichungen und 95 % Konfidenzintervalle berechnet und verglichen werden. Die Alphafehler-Kummulierung wurde mit dem post-test nach Bonferroni korrigiert. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

Bonferroni-Methode:

Aufgrund der multiplen Vergleiche (NK-Zellrezeptoren, IFN-gamma Sekretion) bei der Analyse der verschiedenen Versuchsansätze wurde das Signifikanzniveau nach der Bonferroni-Methode korrigiert, um die Wahrscheinlichkeit von falsch-positiven (signifikanten) Ergebnissen zu minimieren. Bei den Ergebnissen, die korrigiert werden mussten, wurden drei unterschiedliche Signifikanzniveaus festgelegt:

1. Für die Analyse der NK-Zellrezeptoren (NKG2A, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46) in den Ansätzen Medikamentenwirkung auf die NK-Zellen allein wurde das Signifikanzniveau auf $p < 0,01$ festgelegt.
2. Für die Analyse der NK-Zellrezeptoren (NKG2A, NKG2D, NKp44, NKp46) in den Ansätzen Medikamentenwirkung auf die NK-Zellen in Cokultur sowie im Ansatz RPMI-8226-Wirkung auf die NK-Zellen wurde das Signifikanzniveau auf $p < 0,0125$ korrigiert.
3. Das Signifikanzniveau für die Tests der IFN-gamma Antwort wurde auf $p < 0,0167$ (NKG2A, NKG2D, IFN-gamma) korrigiert.

Deutlich veränderte, jedoch nicht signifikante Ergebnisse:

Als deutlich verändert, jedoch nicht signifikant, wurden alle Ergebnisse beschrieben, die deutlich unter dem Signifikanzwert von $p < 0,05$ liegen, jedoch nach der Bonferroni-Korrektur die neu gesetzten Signifikanzwerte knapp nicht erreichen.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss von Myelomzellen auf NK Zellen

Viele Untersuchungen zeigten, dass im Rahmen von malignen Erkrankungen eine Suppression des Immunsystems regelmäßig auftritt. In dieser Versuchsreihe wurde der Effekt der Myelomzelllinie RPMI-8226 auf die Gesamtpopulation der NK Zellen sowie auf die unreife und reife Subpopulation getestet. Des Weiteren wurde die Wirkung der Myelomzellen auf die NK-Zellrezeptoren NKG2A, NKG2D, NKp44 und NKp46 bei NK Zellen und bei deren Subpopulationen sowie auf die IFN-gamma Produktion untersucht.

3.1.1. Anzahl der NK Zellen und ihrer Subpopulationen

Myelomzelllinie RPMI-8226 vermindert die Anzahl der NK Zellen, insbesondere der reifen NK Zellen

Unter dem Einfluss der Myelomzelllinie RPMI-8226 reduzierten sich die NK Zellen auf einen Bruchteil des Ausgangswertes (184600/ml vs 53090/ml, $p=0,0027$, $n=6$, s. Abb. 3). Dazu übereinstimmend zeigte sich die Dichte der CD56-Antigenexpression, gemessen als gMFI (1200 vs 1019, $p=0,02$, $n=4$, s. Abb. 3). Insbesondere die reifen NK Zellen waren in der Anzahl vermindert, während für die unreifen NK Zellen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte (s. Abb. 4).

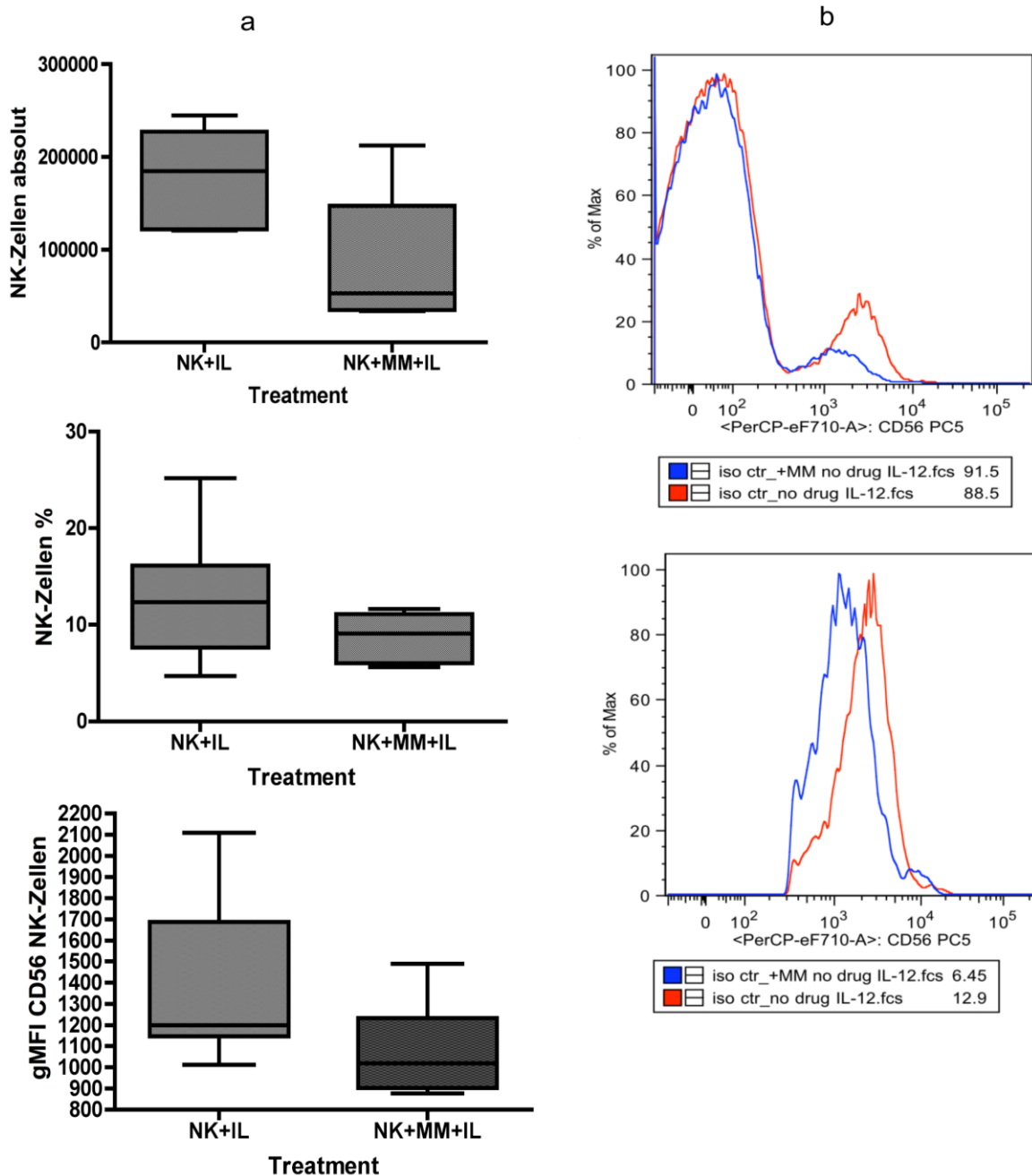


Abb. 3: a) Durchflusszytometrische Untersuchung von NK Zellen, dargestellt als Absolutwerte und Relativwerte von PBMC, dazu Antigenexpression von CD56 als gMFI. Vergleich zwischen NK Zellen allein bzw. Kokultur mit Interleukinen. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Absolut: Median NK Zellen allein: 184600/ml (IQR 122100-227400), Median Kokultur: 53090/ml (IQR 34910-147400), **p=0,0027**; prozentual: Median NK Zellen allein: 12,34 % (IQR 7,64-16,13), Median Kokultur: 9,1 % (IQR 6,03-11,11), **p=0,037**, n=6, t-Test; gMFI CD56: Median NK Zellen allein: 1200 (IQR 1146-1688), Median Kokultur: 1019 (IQR 902,5-1233), **p=0,02**, n=4, t-Test. b) Exemplarisches Histogramm mit NK Zellen ohne Kokultur (rote Kurve) und NK Zellen in Kokultur (blaue Kurve). Obere Graphik: Histogramm der gesamten Lymphozyten mit einer kleinen CD56+ Population, welche in dem Kokulturanatz deutlich kleiner ist. Untere Graphik: Histogramm von lediglich NK Zellen (CD56+CD3-). Hier zeigt sich ebenfalls eine deutliche Verschiebung nach links unter dem Einfluss der Myelomzelllinie RPMI-8226.

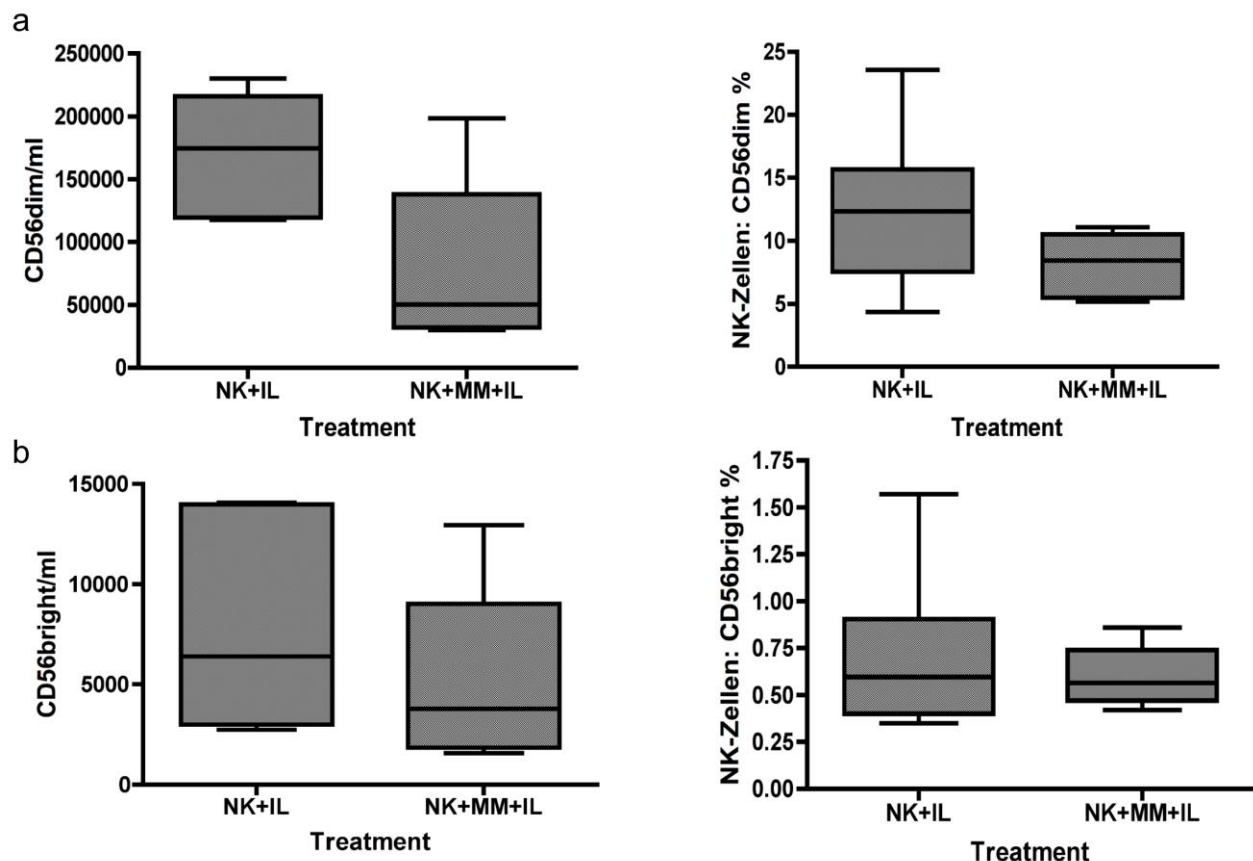


Abb. 4: Durchflusszytometrische Untersuchung der reifen und unreifen Subpopulationen unter dem Einfluss der Myelomzelllinie RPMI-8226, dargestellt als Absolutwerte und Relativwerte von PBMC. Vergleich zwischen NK Zellen allein bzw. Cokultur mit Interleukinen. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall.

a) reife NK Zellen absolut: Median NK Zellen allein: 174700/ml (IQR 119500-216200), Median Cokultur: 50220/ml (IQR 32260-138000), **p=0,0029**; reife NK Zellen prozentual: Median NK Zellen allein: 12,35 % (IQR 8,3-14,8), Median Cokultur: 8,4 % (IQR 5,6-10,2), **p=0,0373**.

b) unreife NK Zellen absolut: Median NK Zellen allein: 6412/ml (IQR 2988-13990), Median Cokultur: 3776/ml (IQR 1847-9021), p=0,097; unreife NK Zellen prozentual: Median NK Zellen allein: 0,595 % (IQR 0,4-0,9), Median Cokultur: 0,57 % (IQR 0,47-0,74), p=0,4, n=6, t-Test.

3.1.2. NK-Zellrezeptoren

NKG2A: keine Veränderung durch Myelomzellen

Die Analyse des NKG2A-Rezeptors bei den NK Zellen, bei der unreifen und bei der reifen Subpopulation ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Ansatzgruppen NK Zellen allein und Cokultur (s. Tab. 7 und s. Anhang Abb. 19, Abb. 20, Abb. 21).

Tab. 7: Wirkung von Myelomzellen auf die NKG2A-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen und in der reifen sowie unreifen Subpopulation. Statistische Analyse der Daten mittels zweiseitigen t-Test für abhängige Stichproben (p-Wert < 0,0125).

NK-Zellpopulation	NK-Zellrezeptor	Median		p-Wert Kontrolle vs. Cokultur	n
		Kontrolle	Cokultur		
NK Zellen	NKG2A	45,9 %	53 %	0,7	5
reife NK Zellen	NKG2A	45,3 %	50,6 %	0,8	5
unreife NK Zellen	NKG2A	90 %	93,3 %	0,44	5

NKG2D: Suppression durch die Myelomzellen

Erwartungsgemäß zeigte sich bei unseren Messungen in der Cokultur ein statistisch signifikanter Rückgang von NKG2D-positiven NK Zellen von 88 % auf 56 %, $p=0,0076$, $n=5$. Dies betraf insbesondere die reife NK-Zellpopulation (s. Abb. 5 und Abb. 6). Auch die Dichte der NKG2D-Expression war im Cokulturansatz um die Hälfte reduziert. Der abfallende Trend der NKG2D-Expression ist klar in den exemplarischen Overlays zu sehen. Im Gegensatz dazu zeigten die unreifen NK Zellen keine Beeinflussung durch die Myelomzellen (s. Anhang Abb. 22).

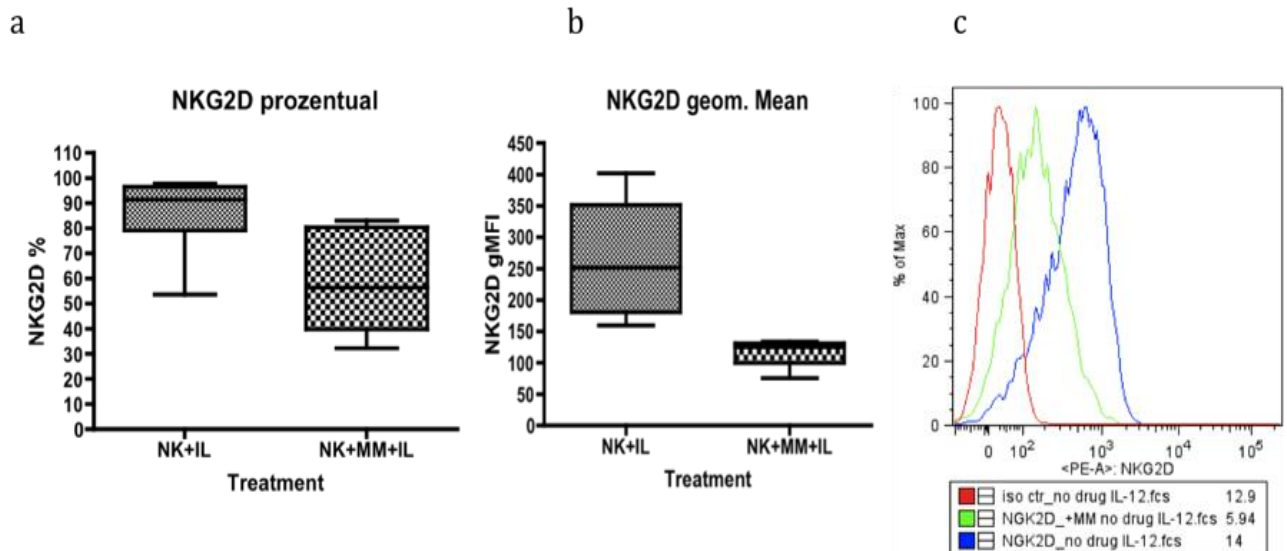


Abb. 5: Durchflusszytometrische Untersuchung von NKG2D-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen unter dem Einfluss der Myelomzellen RPMI-8226, dargestellt in Prozent (a), dazu die Dichte der Antigenexpression von NKG2D als gMFI (b). Vergleich zwischen NK Zellen alleine bzw. Cokultur mit Interleukinen. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall.

a) Median NK Zellen allein: 87,5 % (IQR 79,15-95,3), Median Cokultur: 56,3 % (IQR 39,75-80,45), **p=0,0076**, n=5, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p < 0,0125$).

b) gMFI CD56: Median NK Zellen allein: 251 (IQR 180-351), Median Cokultur: 125 (IQR 98-131), **p=0,0046**, n=4, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p < 0,0125$).

c) Exemplarisches Histogramm mit anti-Maus IgG gefärbten NK Zellen als Isotypkontrolle (rote Kurve), NK Zellen mit Interleukinbehandlung (blaue Kurve) und NK Zellen mit Interleukinen in Cokultur mit der Myelomzelllinie RPMI-8226 (grüne Kurve). Es zeigt sich eine deutliche Reduktion der NKG2D-Expression (Linksverschiebung der Kurve) in der Ansatzgruppe Cokultur im Vergleich zu NK Zellen allein.

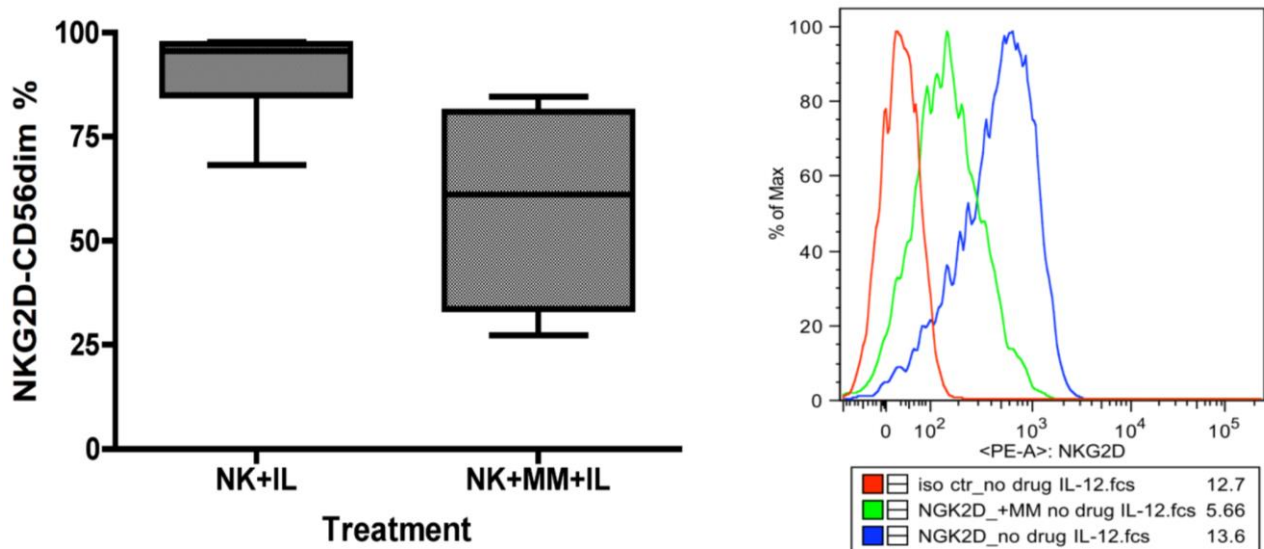


Abb. 6: Durchflusszytometrische Untersuchung von NKG2D-Expression in der reifen NK-Zellpopulation unter dem Einfluss der Myelomzellen RPMI-8226, dargestellt in Prozent und als Histogramm.

Graphik links: Vergleich zwischen NK Zellen allein bzw. Kokultur mit Interleukinen. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median NK Zellen allein: 95,5 % (IQR 85-97), Median Kokultur: 61,1 % (IQR 33,6-81,1), **p=0,0106**, n=5, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p < 0,0125$).

Graphik rechts: exemplarisches Histogramm mit anti-Maus IgG gefärbten NK Zellen als Isotypkontrolle (rote Kurve), NK Zellen mit Interleukinbehandlung (blaue Kurve) und NK Zellen mit Interleukinen und in Kokultur mit Myelomzellen RPMI-8226 (grüne Kurve). Hier zeigte sich ebenfalls eine deutliche Reduktion der NKG2D-Expression (Verschiebung nach links) der reifen NK-Zellpopulation unter dem Einfluss der Myelomzellen RPMI-8226.

NKp44: keine signifikante Änderung des NKp44-Rezeptors durch die Myelomzellen

In den hier durchgeführten Versuchen zeigte sich keine signifikante Änderung der NKp44-Expression im Kokulturanatz verglichen mit NK Zellen allein, weder bei der Gesamtpopulation der NK Zellen noch bei den Subpopulationen (s. Anhang Abb. 23, Abb. 24, Abb. 25).

NKp46: In der Kokultur mit Myelomzellen zeigt sich ein Trend zur Reduktion von NKp46

Im Kokulturanatz mit der Myelomzelllinie RPMI-8226 zeigten sich bei der Gesamtpopulation der NK Zellen im Vergleich zu NK Zellen allein deutlich niedrigere Werte für die NKp46-Expression (95 % vs 86 %, $p=0,049$, n=4, s. Abb. 7), welche jedoch das Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur nicht mehr erreichten. Dies traf vor allem auf die reife Subpopulation zu, während die unreife NK-Zellpopulation durch die Myelomzellen nicht beeinflusst wurde (s. Anhang Abb. 26).

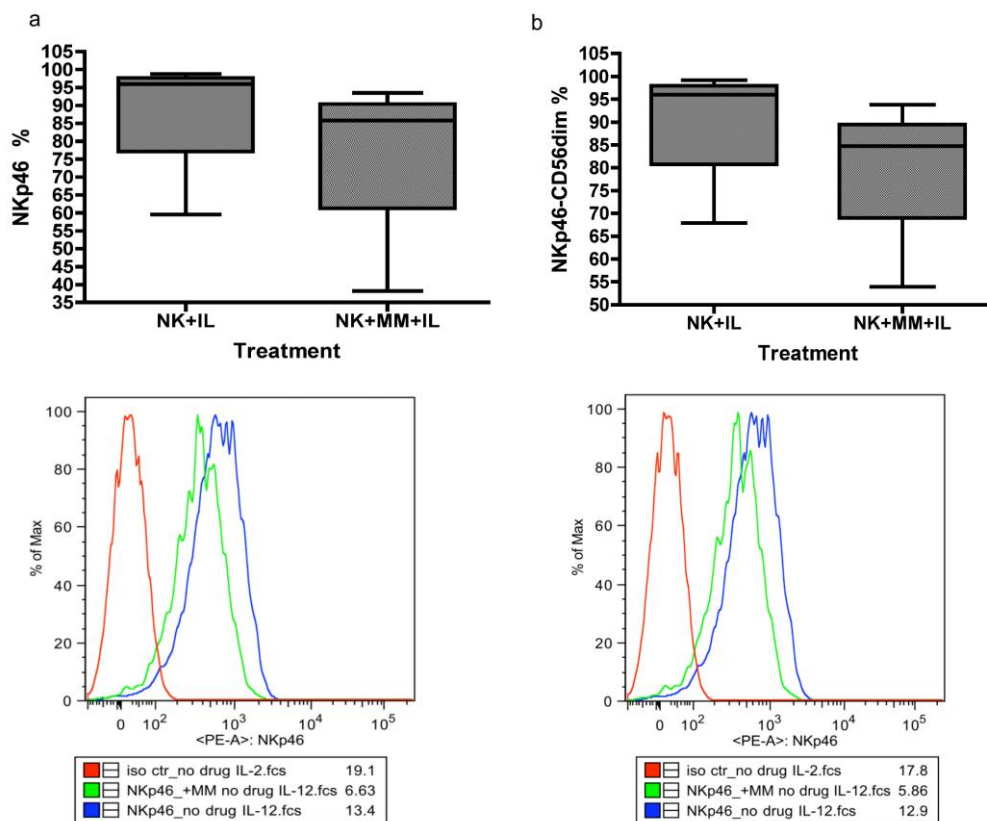


Abb. 7: Durchflusszytometrische Untersuchung von NKp46-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen (a) und in der reifen NK-Zellpopulation (b) unter dem Einfluss der Myelomzellen RPMI-8226, dargestellt in Prozent und als exemplarisches Histogramm. Vergleich zwischen NK Zellen allein bzw. Kokultur mit Interleukinen. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall.

a) Median NK Zellen allein: 95,4 % (IQR 76-97), Median Kokultur: 85,8 % (IQR 61-91), $p=0,049$, $n=4$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,0125$).

b) Median NK Zellen allein: 95 % (IQR 80,4-97), Median Kokultur: 84,7 % (IQR 69-90), $p=0,0141$, $n=4$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,0125$).

Graphiken unten: exemplarisches Histogramm mit anti-Maus IgG gefärbten NK Zellen als Isotypkontrolle (rote Kurve), NK Zellen mit Interleukinbehandlung (blaue Kurve) und NK Zellen mit Interleukinen in Kokultur (grüne Kurve) in der gesamten NK-Zellpopulation (a) und in der reifen Subpopulation (b).

3.1.3. Veränderung der IFN-gamma Produktion unter dem Einfluss der Interleukine und der Myelomzellen

Bei diesem Versuch wurde der Einfluss der Myelomzelllinie RPMI-8226 auf die IFN-gamma Produktion der gesamten NK Zellen und der reifen und unreifen Subpopulationen getestet. Als Negativkontrolle wurden NK Zellen ohne jegliche Behandlung und ohne Myelomzellen verwendet, die Positivkontrolle stellten NK Zellen mit Interleukinbehandlung dar. Gegen die Kontrollgruppen wurden folgende Ansatzgruppen verglichen:

- NK Zellen in Cokultur ohne Interleukine
- NK Zellen in Cokultur mit Interleukinen

Deutlicher Interleukineinfluss auf die IFN-gamma Produktion bei NK Zellen allein und in der Cokultur

Sowohl in der Cokultur als auch im Kontrollansatz zeigten sich signifikant höhere Prozentwerte für IFN-gamma positive Zellen unter Interleukinbehandlung in der gesamten NK-Zellpopulation (Cokultur: 4 % vs 43 %, $p < 0,0001$; NK Zellen allein: 2 % vs 24 % $p = 0,0003$). Dies traf sowohl auf die unreifen als auch auf die reifen NK Zellen zu (s. Abb. 8, Abb. 9, Abb. 10).

Deutlicher Einfluss von Myelomzellen auf die IFN-gamma Produktion mit und ohne Interleukinbehandlung

Die Zugabe von Myelomzellen führte allein schon zu einem leichten Anstieg der IFN-gamma Produktion und konnte den Effekt der Interleukinbehandlung noch deutlich steigern (auf 43 % IFN-gamma pos. Zellen, s. Abb. 8).

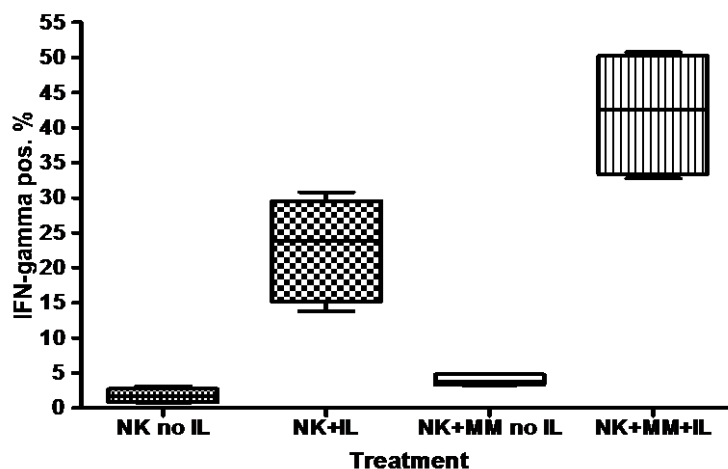


Abb. 8: IFN-gamma Produktion von NK Zellen in Prozent. Vergleich zwischen NK Zellen allein bzw. Cokultur unter Inkubation mit und ohne Interleukine. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall.

1. NK Zellen allein ohne IL vs mit IL: Median ohne IL: 1,66 % (IQR 0,84-2,73), Median mit IL: 23,9 % (IQR 15,2-29,55), **$p = 0,0003$** .
2. NK Zellen allein ohne IL vs Cokultur ohne IL: Median NK Zellen: 1,66 % (IQR 0,84-2,73), Median Cokultur: 3,82 % (IQR 3,3-4,8), **$p < 0,0001$** .
3. NK Zellen allein mit IL vs Cokultur mit IL: Median NK Zellen: 23,9 % (IQR 15,2-29,55), Median Cokultur: 42,65 % (IQR 33,4-50,25), **$p = 0,0002$** .
4. Cokultur ohne IL vs Cokultur mit IL: Median Cokultur ohne IL: 3,82 % (IQR 3,3-4,8), Median Cokultur mit IL: 42,65 % (IQR 33,4-50,25), **$p < 0,0001$** , $n = 2$ (Dreifachansatz), t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p < 0,0167$).

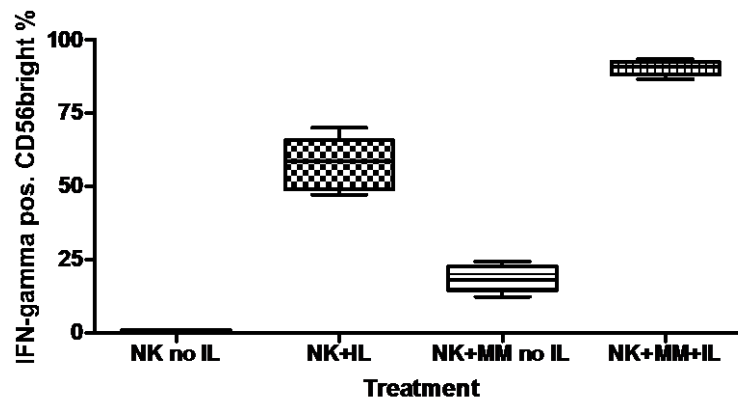


Abb. 9: IFN-gamma Produktion von den unreifen NK Zellen in Prozent. Vergleich zwischen NK Zellen allein bzw. Cokultur unter Inkubation mit und ohne Interleukine. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. 1. NK Zellen allein ohne IL vs mit IL: Median ohne IL: 0,77 % (IQR 0,35-1,05), Median mit IL: 58,35 % (IQR 48,75-65,65), **p<0,0001**. 2. NK Zellen allein ohne IL vs Cokultur ohne IL: Median NK Zellen: 0,77 % (IQR 0,35-1,05), Median Cokultur: 17,95 % (IQR 14,6-22,7), **p<0,0001**. 3. NK Zellen allein mit IL vs Cokultur mit IL: Median NK Zellen: 58,35 % (IQR 48,75-65,65), Median Cokultur: 90,6 % (IQR 88,1-92,45), **p=0,0003**. 4. Cokultur ohne IL vs Cokultur mit IL: Median Cokultur ohne IL: 17,95 % (IQR 14,6-22,7), Median Cokultur: 90,6 % (IQR 88,1-92,45), **p<0,0002**, n=2 (Dreifachansatz), t-Test, Bonferroni-Korrektur (p<0,0167).

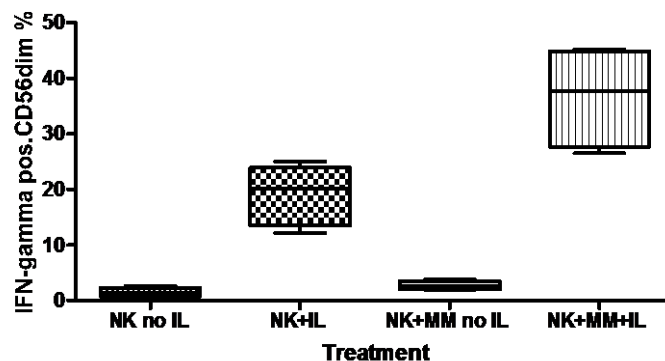


Abb. 10: IFN-gamma Produktion von den reifen NK Zellen in Prozent. Vergleich zwischen NK Zellen allein bzw. Cokultur unter Inkubation mit und ohne Interleukine. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. 1. NK Zellen allein ohne IL vs mit IL: Median ohne IL: 1,5 % (IQR 0,8-2,37), Median mit IL: 20,20 % (IQR 13,5-23,9), **p=0,0001**. 2. NK Zellen allein ohne IL vs Cokultur ohne IL: Median NK Zellen: 1,5 % (IQR 0,8-2,37), Median Cokultur: 2,62 % (IQR 2,1-3,5), **p<0,0015**. 3. NK Zellen allein mit IL vs Cokultur mit IL: Median NK Zellen: 20,20 % (IQR 13,5-23,9), Median Cokultur: 37,65 % (IQR 27,7-44,85), **p=0,001**. 4. Cokultur ohne IL vs Cokultur mit IL: Median Cokultur ohne IL: 2,62 % (IQR 2,1-3,5), Median Cokultur: 37,65 % (IQR 27,7-44,85), **p<0,0002**, n=2 (Dreifachansatz), t-Test, Bonferroni-Korrektur (p<0,0167).

3.2. Einfluss von Medikamenten auf die NK Zellen

Es wurde der Effekt der Medikamente Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib auf die Gesamtpopulation der NK Zellen, die unreife und die reife Subpopulation, auf die NK-Zellrezeptoren (NKG2A, NKG2D, NKp30, NKp44 und NKp46) sowie auf die IFN-gamma Antwort nach 24 Stunden Inkubation untersucht. Verglichen wurde jeweils die mit einem Medikament und mit Interleukinen behandelte Probe mit der Kontrollgruppe (nur Interleukinbehandlung, kein Medikament).

3.2.1. Anzahl der NK Zellen und ihrer Subpopulationen

Die Behandlung mit Thalidomid, Lenalidomid und Bortezomib führte nicht zu einem statistisch signifikanten Unterschied bezüglich der Zellzahl im Vergleich zum Kontrollansatz. Allerdings zeigte sich unter Bortezomibbehandlung eine deutliche Reduktion der Antigendichte von CD56 (ausgedrückt als gMFI, s. Abb. 11) im Vergleich zum Kontrollansatz.

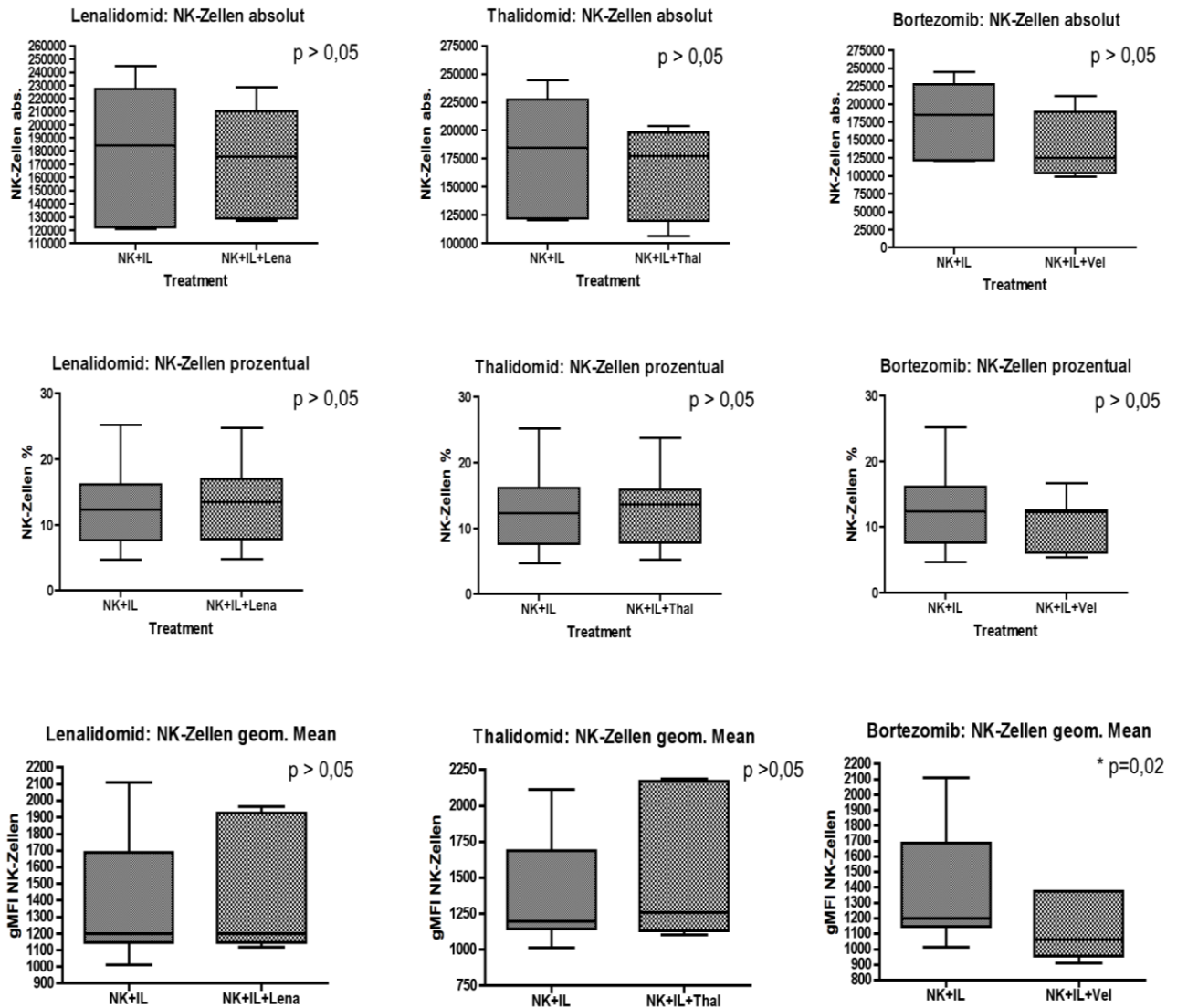


Abb. 11: Einfluss der Medikamente Lenalidomid (Lena), Thalidomid (Thal) und Bortezomib (Vel) auf die NK Zellen dargestellt als Absolutwerte und Relativwerte von PBMC, dazu die Antigenexpression von CD56 als gMFI. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Ein signifikanter Rückgang der Antigendichte von CD56 in der Gesamtpopulation der NK Zellen zeigte sich nur unter Bortezomibbehandlung. Median kein Medikament 1200, IQR (1146-1688) Median Bortezomib (Vel) 1062 (IQR 945,5-1374), **p=0,02**, n=3 (Doppelansatz), t-Test.

3.2.2. NK-Zellrezeptoren

NKG2A: Keine Änderung der NKG2A-Expression durch IMiDs oder Bortezomib

Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib haben keine signifikante Änderung der Anzahl der NKG2A-exprimierenden Zellen in der Gesamtpopulation der NK Zellen bewirkt. Auch die Dichte des NKG2A-Rezeptors auf den NK Zellen änderte sich nicht (s. Anhang Abb. 27). In den Subpopulationen konnte unter IMiDs und Bortezomib weder in der reifen noch in der unreifen NK-Zellpopulation ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der NKG2A-Expression zum Kontrollansatz festgestellt werden (s. Tab. 8, s. Anhang Abb. 28 und Abb.29).

Tab. 8: Wirkung von Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib auf die NKG2A-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen und in der reifen sowie unreifen Subpopulation. Statistische Analyse der Daten mittels zweiseitigen t-Test für abhängige Stichproben (p-Wert < 0,01)

NK-Zellpopulation	NK-Zellrezeptor	Behandlung	Median Kontrolle vs. behandelt	p-Wert Kontrolle vs. behandelt	n
NK Zellen	NKG2A	Lenalidomid	47,7 % vs. 49 %	0,69	7
		Thalidomid	47,7 % vs. 46,8 %	0,011	
		Bortezomib	47,7 % vs. 46,4 %	0,06	
reife NK Zellen	NKG2A	Lenalidomid	45,3 % vs. 46,2 %	0,5	7
		Thalidomid	45,3 % vs. 44 %	0,003	
		Bortezomib	45,3 % vs. 43,8 %	0,3	
unreife NK Zellen	NKG2A	Lenalidomid	90 % vs. 92 %	0,16	7
		Thalidomid	90 % vs. 91,5 %	0,72	
		Bortezomib	90 % vs. 92,8 %	0,5	

NKG2D: Signifikante Abnahme der NKG2D-Expression durch Bortezomibbehandlung, aber nicht durch IMiDs

Die Behandlung mit IMiDs bewirkte keine Änderung der NKG2D-Expression (s. Abb. 12). Unter Bortezomibbehandlung zeigte sich jedoch eine deutliche Reduktion der NKG2D-exprimierenden NK Zellen (von 95 % auf 77 %, $p=0,0075$, $n=7$). Des Weiteren nahm auch die Dichte des NKG2D-Rezeptors, dargestellt als gMFI, unter Bortezomibbehandlung deutlich ab (251 vs 173, $p=0,0074$, $n=4$). Auch die reife Subpopulation zeigte unter Bortezomibbehandlung deutlich niedrigere Werte für die NKG2D-Expression (96 % vs 81 %, $p=0,0125$), welche jedoch nach Bonferroni-Korrektur das Signifikanzniveau nicht mehr erreichten (s. Anhang Abb. 30). Bei den unreifen NK Zellen zeichneten sich keine

statistisch signifikanten Unterschiede in der NKG2D-Expression nach IMiD- oder Bortezomibbehandlung ab (s. Anhang Abb. 31).

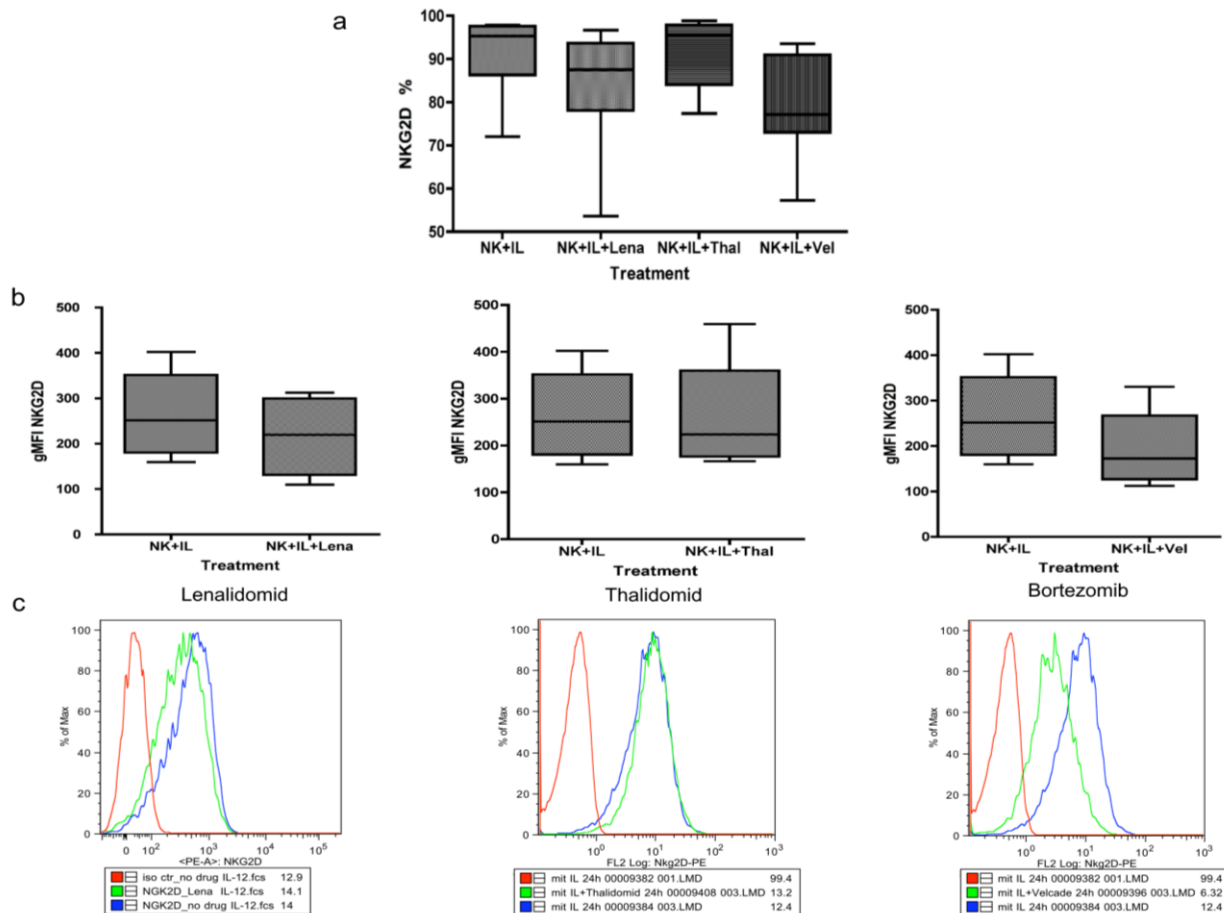


Abb. 12: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKG2D-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent, dazu die Antigenexpression von NKG2D als gMFI. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall.

a) Median kein Medikament: 95,3 % (IQR 86,3-97,6), Median Lenalidomid: 87,5 % (IQR 78,1-93,7), $p=0,026$, Median Thalidomid 95,5 % (IQR 84-97,9), $p=0,32$, Median Bortezomib 77,1 % (IQR 73-91), **$p=0,0075$** , $n=7$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,01$).

b) Vergleich der Dichte des NKG2D-Rezeptors, dargestellt als gMFI, zwischen NK Zellen behandelt mit Interleukinen und NK Zellen behandelt mit Interleukinen und Medikamenten. Median kein Medikament: 251,3 (IQR 180-352), Median Lenalidomid: 219,7 (IQR 130-299), $p=0,147$, Median Thalidomid: 223,6 (IQR 176-360), $p=0,93$, Median Bortezomib: 172,6 (IQR 128-269), **$p=0,0074$** , $n=4$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,01$).

c) Exemplarisches Histogramm mit anti-Maus IgG gefärbten NK Zellen als Isotypkontrolle (rote Kurve), NK Zellen mit Interleukinbehandlung (blaue Kurve) und NK Zellen mit Interleukinen und jeweils Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib (grüne Kurve).

NKp30: Bortezomib führt zu einer stärkeren Abnahme der NKp30 positiven Zellen als die IMiDs

Unter der Behandlung mit IMiDs zeigten sich deutlich niedrigere Werte für NKp30 positive Zellen in der Gesamtpopulation der NK Zellen, welche jedoch nach Bonferroni-Korrektur das Signifikanzniveau nicht mehr erreichten. Allerdings konnte unter Bortezomibbehandlung eine signifikante Abnahme der NKp30-exprimierenden Zellen in der Gesamtpopulation der NK Zellen gemessen werden (48 % vs 24 %, $p=0,0067$). Bei den reifen NK Zellen zeigte sich eine deutliche, jedoch nicht signifikante Verminderung der NKp30-Expression unter IMiDs- und Bortezomibbehandlung. Es zeigte sich keine signifikante Verminderung der NKp30-Expression in der unreifen NK Zellpopulation unter den oben aufgeführten Medikamenten (s. Anhang Abb. 32 und Abb. 33).

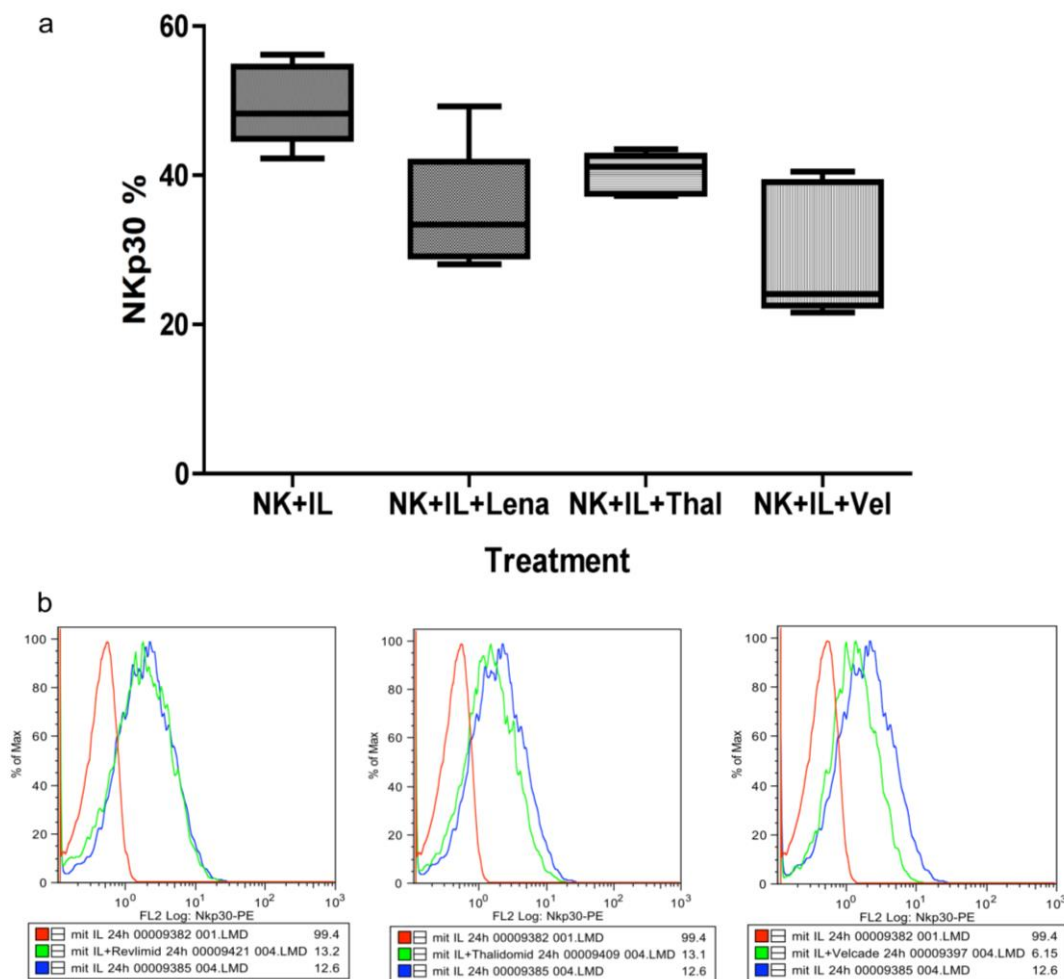


Abb. 13: a) Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp30-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen, dargestellt in Prozent unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 48,3 % (IQR 45-55), Median Lenalidomid: 33,40 % (IQR 29-42), $p=0,012$, Median Thalidomid 41,2 % (IQR 38-43), $p=0,021$, Median Bortezomib 24,1 % (IQR 23-39), **$p=0,0067$** , $n=5$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,01$).

b) Exemplarisches Histogramm mit anti-Maus IgG gefärbten NK Zellen als Isotypkontrolle (rote Kurve), NK Zellen mit Interleukinbehandlung (blaue Kurve) und NK Zellen mit Interleukinen und jeweils Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib (grüne Kurve).

NKp44 und NKp46: Keine signifikanten Änderungen der NKp44- und NKp46-Rezeptorexpression durch IMiDs und Bortezomib

Die Behandlung mit IMiDs bzw. Bortezomib hatte keinen Einfluss auf die Expression von NKp44 (s. Tab. 9 und s. Anhang Abb. 34, Abb. 35, Abb. 36) oder NKp46 (s. Tab. 10 und s. Anhang Abb. 37, Abb. 38, Abb. 39). Dies traf auf alle Subpopulationen zu.

Tab. 9: Wirkung von Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib auf die NKp44-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen und in der reifen sowie unreifen Subpopulation. Statistische Analyse der Daten mittels zweiseitigen t-Test für abhängige Stichproben (p-Wert < 0,01)

NK-Zellpopulation	NK-Zellrezeptor	Behandlung	Median Kontrolle vs. behandelt	p-Wert Kontrolle vs. behandelt	n
NK Zellen	NKp44	Lenalidomid	8,3 % vs. 7,2 %	0,096	5
		Thalidomid	8,3 % vs. 9 %	0,5	
		Bortezomib	8,3 % vs. 3,5 %	0,16	
reife NK Zellen	NKp44	Lenalidomid	5 % vs. 3,1 %	0,16	5
		Thalidomid	5 % vs. 3,7 %	0,5	
		Bortezomib	5 % vs. 2,6 %	0,2	
unreife NK Zellen	NKp44	Lenalidomid	57 % vs. 51,4 %	0,06	5
		Thalidomid	57 % vs. 57 %	0,4	
		Bortezomib	57 % vs. 36,6 %	0,02	

Tab. 10: Wirkung von Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib auf die NKp46-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen und in der reifen sowie unreifen Subpopulation. Statistische Analyse der Daten mittels zweiseitigen t-Test für abhängige Stichproben (p-Wert < 0,01)

NK-Zellpopulation	NK-Zellrezeptor	Behandlung	Median Kontrolle vs. behandelt	p-Wert Kontrolle vs. behandelt	n
NK Zellen	NKp46	Lenalidomid	96 % vs. 91 %	0,25	5
		Thalidomid	96 % vs. 95,5 %	0,96	
		Bortezomib	96 % vs. 77,4 %	0,04	
reife NK Zellen	NKp46	Lenalidomid	96 % vs. 90,3 %	0,24	5
		Thalidomid	96 % vs. 95,2 %	0,87	
		Bortezomib	96 % vs. 80,1 %	0,09	
unreife NK Zellen	NKp46	Lenalidomid	97 % vs. 90,4 %	0,47	5
		Thalidomid	97 % vs. 97 %	0,6	
		Bortezomib	97 % vs. 85,3 %	0,37	

3.2.3. Medikamenteneinfluss auf die IFN-gamma Produktion der NK Zellen

Kein Einfluss von IMiDs oder Bortezomib auf die IFN-gamma Produktion der NK Zellen

Weder die Behandlung mit IMiDs noch mit Bortezomib führte zu einem signifikanten Unterschied bezüglich der IFN-gamma Produktion der NK Zellen. Dies betraf alle Subpopulationen (s. Abb. 14).

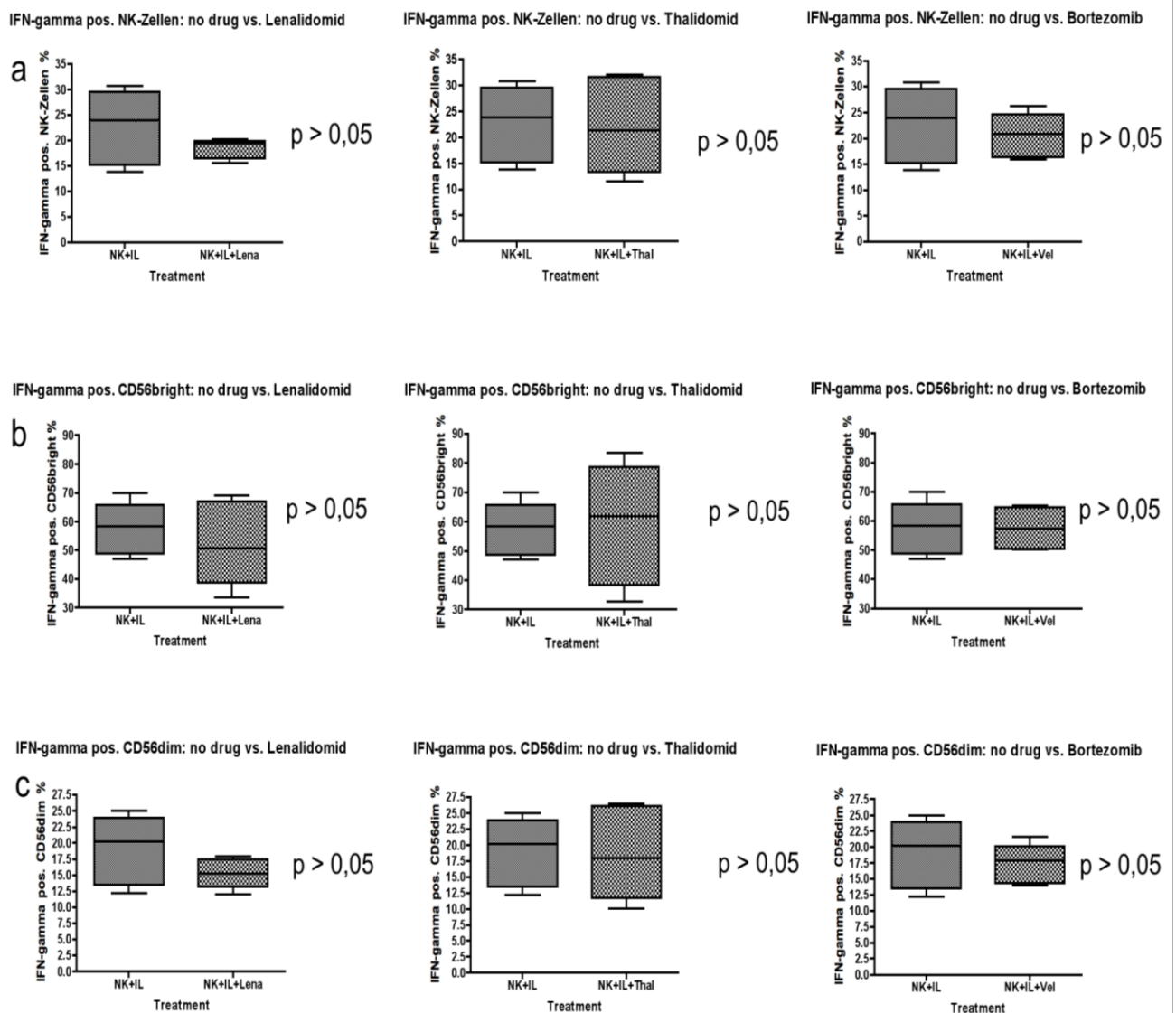


Abb. 14: Einfluss der Medikamente Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib auf die IFN-gamma Produktion der a) Gesamtpopulation der NK Zellen und der entsprechenden Subpopulationen b) CD56bright und c) CD56dim dargestellt als Prozentwerte. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Durch die Medikamente konnte keine statistisch signifikante Änderung der IFN-gamma Produktion erreicht werden. $p > 0,05$, $n=2$ (Dreifachansatz), t-Test.

3.3. Einfluss von IMiDs und Bortezomib in Anwesenheit von Myelomzellen

3.3.1. Anzahl der NK Zellen und ihrer Subpopulationen

Nach der Behandlung mit IMiDs zeigte sich ein geringer Anstieg der NK-Zellzahl (9 % vs 10 % unter Lenalidomid bzw. 11 % unter Thalidomid, s. Abb. 15) und somit ein minimaler Trend zur Aufhebung des negativen Einflusses von Myelomzellen. Dieser Trend konnte lediglich in der reifen NK-Zellpopulation beobachtet werden (s. Abb. 16), wogegen es in der unreifen Subpopulation zu keiner Änderung der Zellzahl unter IMiDs kam (s. Anhang Abb. 40). Die Behandlung mit Bortezomib führte zu keiner Veränderung der NK-Zellzahl. Dies traf auf alle Subpopulationen zu.

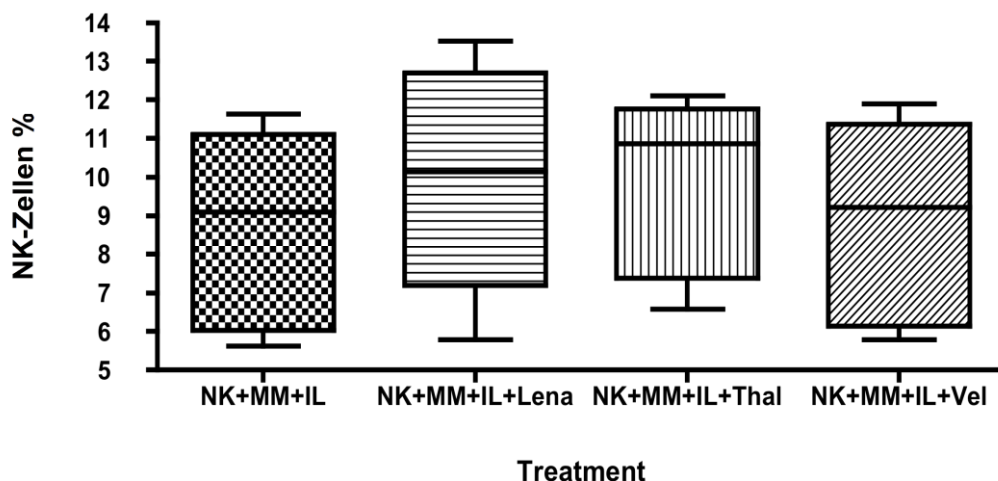


Abb. 15: NK Zellen in Cokultur unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 9,1 % (IQR 6,03-11,11), Median Lenalidomid: 10,14 % (IQR 7,19-12,70), **p=0,0094**, Median Thalidomid 10,87 % (IQR 7,375-11,77), **p=0,0221**, Median Bortezomib 9,22 % (IQR 6,145-11,37), p=0,74, n=6, t-Test.

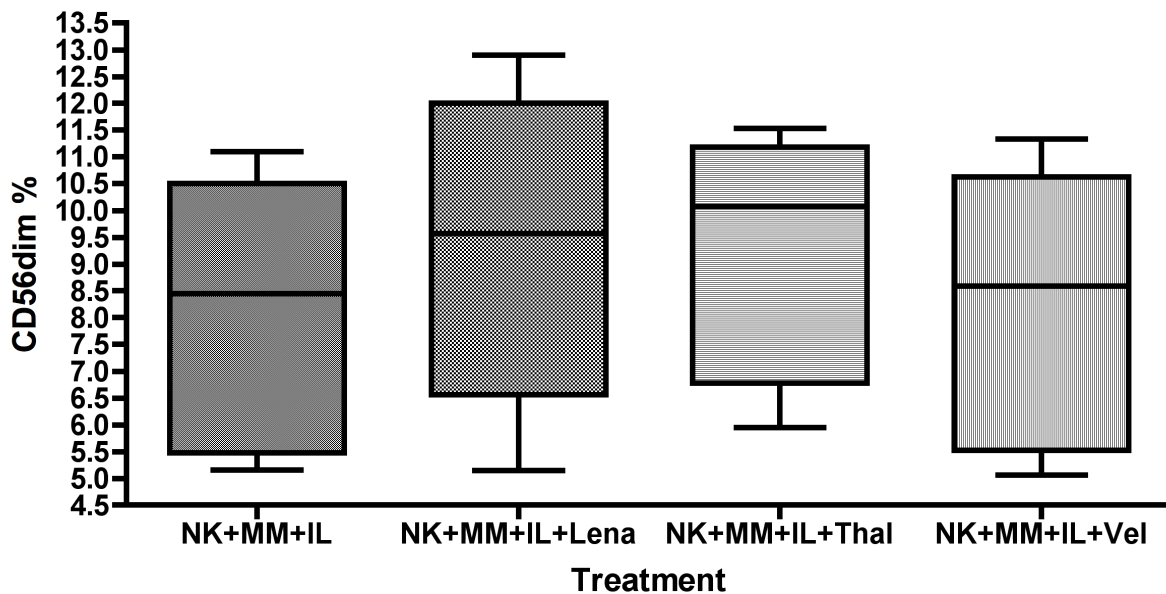


Abb. 16: Reife NK Zellen in Cokultur unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 8,4 % (IQR 5,6-10,5), Median Lenalidomid: 9,57 % (IQR 6,5-12), **p=0,0125**, Median Thalidomid 10,08 % (IQR 6,8-11,2), **p=0,03**, Median Bortezomib 8,6 % (IQR 5,5-10,5), p=0,82, n=6, t-Test.

3.3.2. NK-Zellrezeptoren

NKG2A: Keine Änderung der NKG2A-Expression unter IMiDs und Bortezomib in Cokultur

In der Cokultur führte die Behandlung mit IMiDs und Bortezomib zu keiner Änderung der NKG2A-Expression, weder in der Gesamtpopulation der NK Zellen noch in den beiden Subpopulationen (s. Anhang Abb. 41, Abb. 42, Abb. 43).

NKG2D: Keine signifikante Änderung der NKG2D-Expression nach Behandlung mit IMiDs und Bortezomib in der Cokultur

Entgegen meinen Erwartungen zeigten sich zwar nicht signifikant, aber dennoch deutlich niedrigere Werte für die NKG2D-exprimierenden Zellen in der Gesamtpopulation der NK Zellen (56 % vs 41 %, s. Abb. 17) sowie bei den reifen NK Zellen (61 % vs 47 %, s. Anhang Abb. 44) im Cokulturansatz unter Lenalidomidbehandlung. Des Weiteren konnte trotz eines deutlichen Trends zur niedrigeren NKG2D-Antigenexpressionsdichte auf den NK Zellen in Cokultur nach Lenalidomidbehandlung (gMFI 125 vs 79), auch hier das Signifikanzniveau nicht erreicht werden (s. Abb. 17).

Unter Bortezomibbehandlung zeigten sich in der Gesamtpopulation der NK Zellen in der Gruppe NK Zellen allein eine deutlich geringere Anzahl an NKG2D-exprimierenden NK Zellen (95 % ohne Medikament vs 77 % unter Bortezomib, $p=0,0075$, s. Abb. 12), während es im Cokulturansatz zu keinen wesentlichen Unterschieden nach der Bortezomibbehandlung gekommen ist (56 % ohne Medikament vs 59 % unter Bortezomib, s. Abb. 17).

Bei den unreifen NK Zellen ließen sich unter den jeweiligen Medikamenten keine statistisch signifikanten Unterschiede erkennen (s. Anhang Abb. 45).

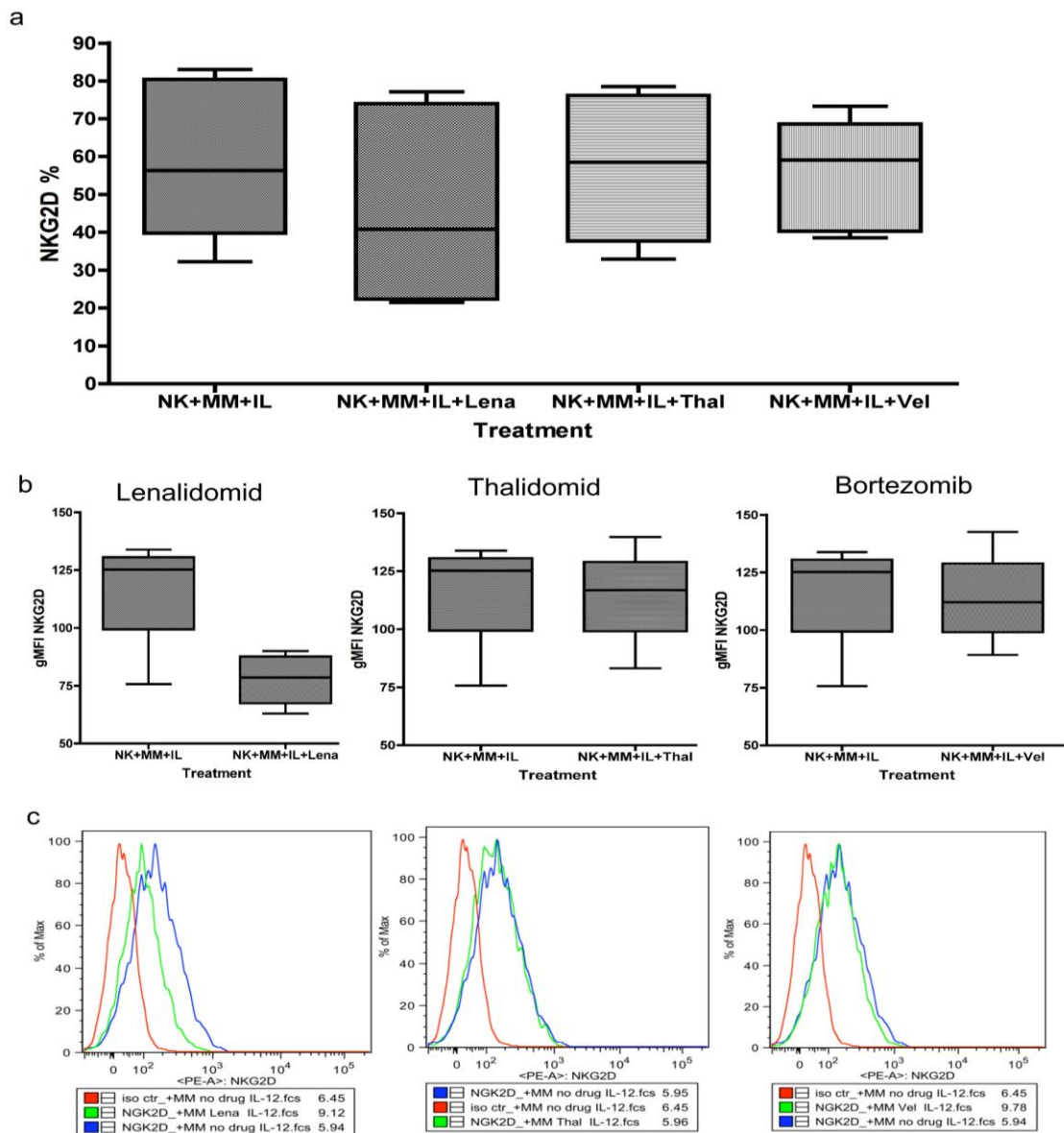


Abb. 17: a) Durchflusszytometrische Untersuchung der NKG2D-Expression bei NK Zellen in Cokultur unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 56,3 % (IQR 39,8-81), Median Lenalidomid: 40,8 % (IQR 22,4-74), $p=0,027$, Median Thalidomid 58,5 % (IQR 38-76), $p=0,2$, Median Bortezomib 59,1 % (IQR 40-69), $p=0,4$, $n=5$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,0125$).

b) Vergleich von NKG2D-Expressionsdichte als gMFI zwischen NK Zellen in Cokultur mit Interleukinen und NK Zellen in Cokultur mit Interleukinen und Medikamenten. Median kein Medikament: 125 (IQR 98-131,4), Median Lenalidomid: 79 (IQR 67-87), $p=0,0255$, Median Thalidomid: 117 (IQR 98-128), $p=0,86$, Median Bortezomib: 112 (IQR 98-129), $p=0,89$, $n=4$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,0125$).

c) Exemplarisches Histogramm mit anti-Maus IgG gefärbten NK Zellen als Isotypkontrolle (rote Kurve), NK Zellen mit Interleukinbehandlung (blaue Kurve) und NK Zellen mit Interleukinen und jeweils Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib (grüne Kurve).

NKp44 und NKp46: Keine Änderung der NKp44- und NKp46-Expression auf NK Zellen in der Cokultur unter IMiDs und Bortezomib

Weder in der Gesamtpopulation der NK Zellen noch in den beiden Subpopulationen konnte ein Einfluss auf die NKp44- und NKp46-Expression durch die IMiDs oder Bortezomibbehandlung in der Cokultur nachgewiesen werden (s. Tab. 11 und Tab. 12, s. Anhang Abb. 46, Abb. 47, Abb. 48, Abb. 49, Abb. 50, Abb. 51). Thalidomideinfluss konnte bei den NKp44-Rezeptoren aufgrund einer misslungenen Messreihe und daraus resultierender zu geringer Anzahl der Messwerte (n=3) nicht ausgewertet werden.

Tab. 11: Wirkung von Lenalidomid und Bortezomib auf die NKp44-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen und in der reifen sowie unreifen Subpopulation in der Cokultur mit Myelomzellen. Statistische Analyse der Daten mittels zweiseitigen t-Test für abhängige Stichproben (p-Wert < 0,0125)

NK-Zellpopulation	NK-Zellrezeptor	Behandlung	Median Kontrolle vs. behandelt	p-Wert Kontrolle vs. behandelt	n
NK Zellen	NKp44	Lenalidomid	10,3 % vs. 5,9 %	0,133	4
		Bortezomib	10,3 % vs. 8,3 %	0,32	
reife NK Zellen	NKp44	Lenalidomid	5,8 % vs. 4,1 %	0,14	4
		Bortezomib	5,8 % vs. 5,45 %	0,5	
unreife NK Zellen	NKp44	Lenalidomid	42,8 % vs. 34,9 %	0,035	4
		Bortezomib	42,8 % vs. 33,8 %	0,06	

Tab. 12: Wirkung von Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib auf die NKp46-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen und in der reifen sowie unreifen Subpopulation in der Cokultur mit Myelomzellen. Statistische Analyse der Daten mittels zweiseitigen t-Test für abhängige Stichproben (p-Wert < 0,0125)

NK-Zellpopulation	NK-Zellrezeptor	Behandlung	Median Kontrolle vs. behandelt	p-Wert Kontrolle vs. behandelt	n
NK Zellen	NKp46	Lenalidomid	85,8 % vs. 80 %	0,0755	4
		Thalidomid	85,8 % vs. 81 %	0,0389	
		Bortezomib	85,8 % vs. 81 %	0,04	
reife NK Zellen	NKp46	Lenalidomid	84,7 % vs. 79 %	0,068	4
		Thalidomid	84,7 % vs. 79,5 %	0,098	
		Bortezomib	84,7 % vs. 79 %	0,079	
unreife NK Zellen	NKp46	Lenalidomid	85,9 % vs. 83 %	0,76	4
		Thalidomid	85,9 % vs. 82,6 %	0,3	
		Bortezomib	85,9 % vs. 79 %	0,36	

3.3.3. Medikamenteneinfluss auf die IFN-gamma Produktion der NK Zellen in Cokultur mit Myelomzellen

Verminderte IFN-gamma Produktion unter IMiDs in der Gesamtpopulation der NK Zellen und bei den reifen NK Zellen in der Cokultur

Die Behandlung mit IMiDs führte in der Cokultur unerwarteterweise zu einer deutlich verminderten IFN-gamma Produktion in der Gesamtpopulation der NK Zellen (43 % ohne Medikament vs 26 % unter Lenalidomid, $p < 0,0001$, s. Abb. 18). Dies betraf vor allem die reife NK-Zellpopulation (38 % ohne Medikament vs 20 % unter Lenalidomid, $p < 0,0001$), während in der unreifen NK-Zellpopulation, trotz eines Trends zu niedrigerer IFN-gamma Produktion, das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde. In keiner der NK-Zellpopulationen führte die Behandlung mit Bortezomib zu einer Änderung der IFN-gamma Produktion.

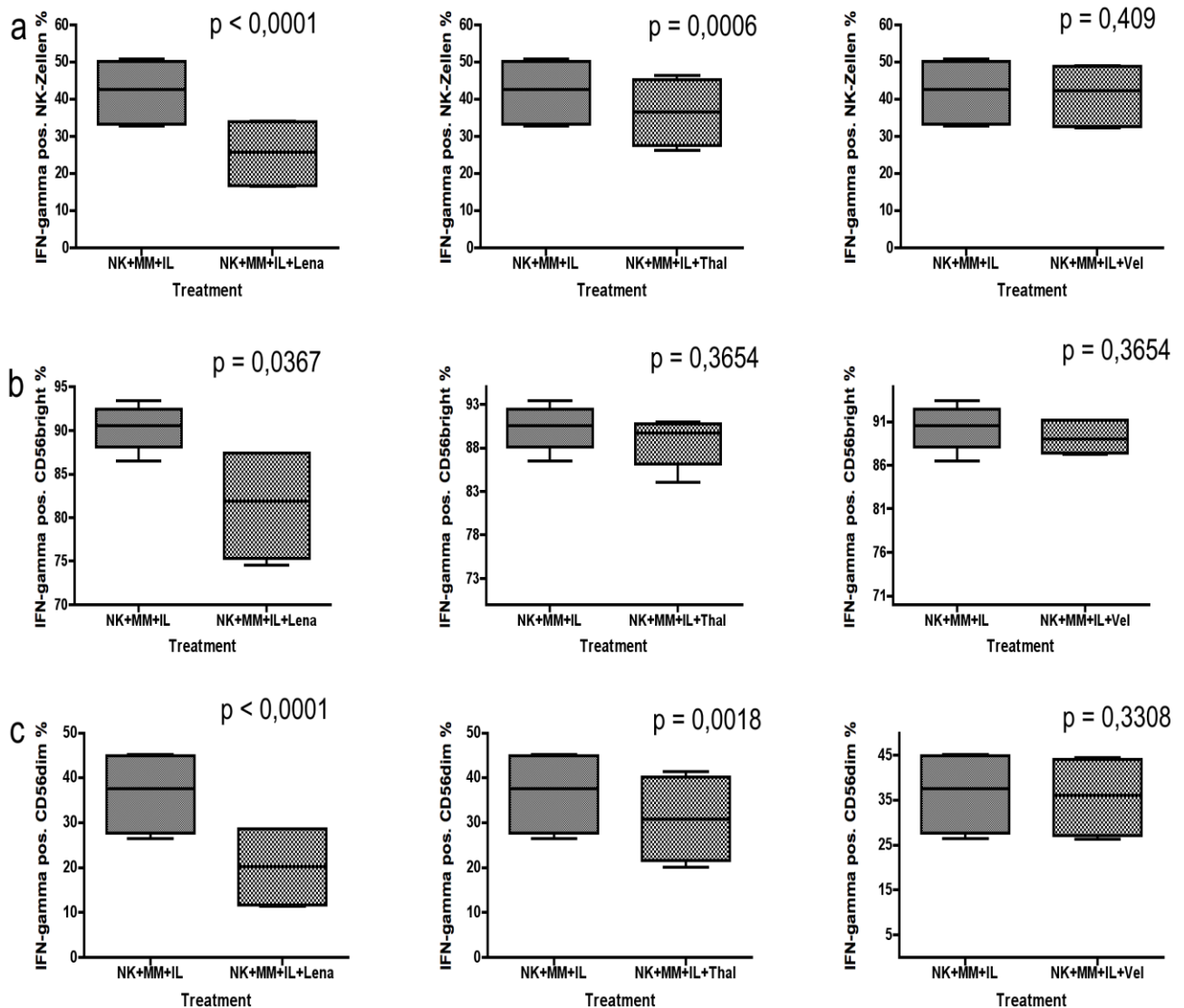


Abb. 18: Einfluss der Medikamente Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib auf die IFN-gamma Produktion der a) gesamten NK Zellen sowie der Subpopulationen b) CD56bright und c) CD56dim in Cokultur, dargestellt als Prozentwerte. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. a) Median kein Medikament: 42,65 % (IQR 33,4-50,25), Median Lenalidomid: 25,7 % (IQR 16,75-34), **$p < 0,0001$** , Median Thalidomid 36,65 % (IQR 27,55-45,35), **$p = 0,0006$** , Median Bortezomib 42,3 % (IQR 32,7-48,95), $p = 0,409$. b) Median kein Medikament: 90,6 % (IQR 88,1-92,45), Median Lenalidomid: 81,9 % (IQR 75,3-87,4), $p = 0,0367$, Median Thalidomid 89,75 % (IQR 86,15-90,75), $p = 0,3654$, Median Bortezomib 89 % (IQR 87,45-91,2), $p = 0,3654$. c) Median kein Medikament: 37,65 (IQR 27,7-44,85) %, Median Lenalidomid: 20,25 (IQR 11,7-28,6) %, **$p < 0,0001$** , Median Thalidomid 30,8 (IQR 21,6-40,15) %, **$p = 0,0018$** , Median Bortezomib 36,2 (IQR 27,1-44,2) %, $p = 0,3308$, $n = 2$ (Dreifachansatz), t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p < 0,016$).

4. Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen beschäftigten sich hauptsächlich mit zwei Themen: 1. Effekte der Myelomzelllinie RPMI-8226 auf die NK Zellen und 2. Aufhebung der myelominduzierten Effekte durch IMiDs und Bortezomib sowie deren Wirkung auf die NK Zellen außerhalb einer Cokultur mit RPMI-8226.

Die hier ermittelten Ergebnisse zeigen einerseits einen supprimierenden Effekt der Myelomzellen RPMI-8226 auf die NK Zellen aufgrund der signifikant verminderten NK-Zellzahl und NKG2D-Expression. Dies lässt sich möglicherweise durch Erschöpfung der NK Zellen erklären, denn andererseits wurde eine zur Suppression simultane Aktivierung der NK Zellen anhand einer deutlich höheren IFN-gamma Produktion beobachtet. Die supprimierende Wirkung der Myelomzelllinie auf die NK Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit kaum durch die Behandlung mit IMiDs aufgehoben werden. Vielmehr weisen die Ergebnisse auf eine Verstärkung der NK-Zellsuppression in Anbetracht verminderter IFN-gamma Produktion unter der gleichzeitigen Wirkung der Myelomzellen und IMiDs hin. Allenfalls konnte durch die Behandlung mit IMiDs ein geringfügiger Anstieg der NK-Zellzahl in Cokultur mit den Myelomzellen erzielt werden.

Bortezomib konnte den negativen Effekt der Myelomzellen auf die NK Zellen nicht beeinflussen. Stattdessen konnte eine zusätzliche suppressive Wirkung auf die NK Zellen über eine verminderte NKG2D- und NKp30-Expression unter Bortezomib festgestellt werden.

Der supprimierende Effekt durch verschiedene maligne Erkrankungen und Neoplasien auf die NK Zellen einerseits, aber auch die wichtige Rolle der NK Zellen in der Verteidigung und Bekämpfung multipler Neoplasien, u.a. auch des MM, andererseits sind bereits mehrfach in der Literatur beschrieben worden. Die NK Zellen stellen einen wichtigen und ersten Verteidigungsmechanismus des angeborenen Immunsystems gegen eine Vielzahl von Tumoren dar. Eine elf Jahre dauernde follow-up Studie zeigte, dass eine stabile und sichere zytolytische Aktivität der NK Zellen mit einem reduzierten Risiko für Krebserkrankungen assoziiert ist (Imai et al., 2000). Die NK-Zellaktivität unterliegt einer genau abgestimmten Interaktion zwischen aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren. Um maligne Zellen zerstören zu können, brauchen NK Zellen größtenteils aktivierende Signale, welche vor allem durch aktivierende Rezeptoren wie z.B. NKG2D und NCR (NKp30, NKp44 und NKp46) vermittelt werden (Moretta et al., 2001).

4.1. Einfluss der Myelomzellen auf die NK Zellen, NK-Zellrezeptoren und IFN-gamma Produktion

Von den bereits erwähnten NK-Zellrezeptoren wurden besonders gut NKG2D und NKp46 unter dem Einfluss von Myelomzellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit MM eine signifikante Verminderung der NKG2D-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen haben. Die verminderte NKG2D-Expression erfolgt über eine direkte Wirkung durch MM-NK-Zellkontakt und nicht über die löslichen NKG2D-Liganden, denn nach Inkubation der Lymphozyten mit entweder löslichen NKG2D-Liganden oder Myelomzellen zeigte sich lediglich in der Cokultur mit Myelomzellen eine signifikante Verminderung der NKG2D-Expression (von Lilienfeld-Toal et al., 2010). Einige Studien konnten bei MGUS Patienten Myelomzellen mit einer hohen MICA-Expression und relativ niedrigen löslichen MICA-Werten im peripheren Blut feststellen. Dadurch konnten die NK Zellen die Myelomzellen bei MGUS Patienten, unter anderem über die MICA-NKG2D Interaktion, lange Zeit unter Kontrolle halten (Baier et al., 2013). Im Gegensatz dazu zeigten die Myelomzellen bei Patienten mit MM eine niedrige MICA-Expression und erhöhte Werte für das lösliche MICA im Serum, wodurch die NK-Zellstimulation über den NKG2D-Rezeptor deutlich herabgesetzt wurde (Baier et al., 2013). Auch bei Patienten mit metastasiertem malignen Melanom und bei pädiatrischen Transplantationspatienten, welche anschließend eine PTLD (post-transplant lymphoproliferative disorder) entwickelt haben, war zum einen die NKG2D-Expression und zum anderen die NKp46-Expression auf allen NK Zellen und Subpopulationen signifikant heruntergesetzt (Mirjagic Martinovic et al., 2014; Wiesmayr et al., 2012).

Wie bereits zu erwarten war, zeigte sich auch in den vorliegenden Versuchen nach der Inkubation mit der Myelomzelllinie RPMI-8226 eine deutlich verminderte NKG2D-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen und in der reifen Subpopulation. Auch konnte unter dem Einfluss der Myelomzellen ein deutlicher Rückgang der gesamten NK-Zellzahl sowohl absolut als auch prozentual nachgewiesen werden. Die weiteren Analysen der beiden Subpopulationen zeigten einen signifikanten Rückgang der reifen NK-Zellpopulation, während die unreife NK-Zellpopulation keine wesentlichen Veränderungen der relativen oder absoluten Zellzahl in der Cokultur mit den Myelomzellen aufwies. Bei Untersuchungen der Subpopulationen bei Patienten mit MM konnten ebenfalls signifikant niedrigere Zellzahlen in der reifen NK-Zellpopulation gemessen werden (Fauriat et al.,

2006). Ähnliche Ergebnisse mit einem signifikanten Rückgang der reifen NK-Zellpopulation zeigten sich auch bei pädiatrischen Transplantationspatienten mit PTLD (Wiesmayr et al., 2012). Hinsichtlich der NK-Zellzahlen bei Patienten mit MM finden sich in der Literatur Studien mit unterschiedlichen, zum Teil widersprüchlichen Angaben. Bei der genaueren Betrachtung dieser Studien zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede in dem Patientenkollektiv bezüglich des Alters, des Geschlechts und des Erkrankungsstadiums. Des Weiteren wurden in einige Studien u.a. Patienten eingeschlossen, die bereits vor der NK-Zellmessung Chemotherapeutika erhalten hatten und somit sehr wahrscheinlich einen veränderten Immunzellstatus aufwiesen (Dosani et al., 2015). Diese unterschiedlichen Studien zeigten nach einer Aufarbeitung eine entweder gleichbleibende oder erhöhte NK-Zellzahl bei unbehandelten Patienten mit frühem Erkrankungsstadium. Bei unbehandelten Patienten mit einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium konnten überwiegend verminderte NK-Zellzahlen gemessen werden (Dosani et al., 2015). Auch bei anderen hämatologischen malignen Erkrankungen, wie dem myelodysplastischen Syndrom oder chronisch myeloischer Leukämie, konnten sowohl verminderte NK-Zellzahlen als auch eine eingeschränkte NK-Zellzytotoxizität beobachtet werden (Baier et al., 2013). Zusammenfassend stimmen meine Ergebnisse mit den Ergebnissen anderer Studien überein.

Die Bedeutung der NK Zellen bei der erfolgreichen Bekämpfung und anschließender Kontrolle der Myelomzellen nach einer Erkrankung mit MM zeigt eine Studie mit einer kleinen Gruppe von Patienten mit MM nach einer HDCT mit autologer Stammzelltransplantation (SCT) und mit entweder anschließender kompletter Remission von mindestens 5 Jahren oder einer sehr guten partiellen Remission von mindestens 3 Jahren. Bei diesen Patienten wurden die unterschiedlichen Immunzellpopulationen untersucht. Dabei konnten interessante Veränderungen der Immunzellkonstellation beobachtet werden, u.a. auch eine signifikant gesteigerte Anzahl der gesamten NK Zellen und der reifen NK Zellen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Pessoa de Magalhaes et al., 2013).

Die Veränderungen in der absoluten und relativen Häufigkeit der NK Zellen und der reifen NK-Zellpopulation sowie eine signifikant verminderte Expression des wichtigen aktivierenden Rezeptors NKG2D legen eine eingeschränkte NK-Zellaktivität bei Patienten mit MM nahe. Dies kann, neben einer erhöhten Infektanfälligkeit des Patienten, zu einer

erheblichen Beeinträchtigung der Immunantwort gegen die Grunderkrankung sowie zu einem erhöhten Risiko für ein Zweitmalignom führen.

Die anderen untersuchten Rezeptoren NKG2A, NKp44 und NKp46 wiesen keine signifikanten Veränderungen ihrer Expression unter Cokultivierung mit den Myelomzellen auf, weder in der Gesamtpopulation der NK Zellen noch in den beiden Subpopulationen.

Da NKp44 hauptsächlich auf aktivierten NK Zellen exprimiert wird (Vitale et al., 1998), wäre aufgrund der in der vorliegenden Arbeit gemessenen erhöhten IFN-gamma Sekretion als ein Hinweis auf die Aktivierung der NK Zellen auch eine Steigerung der NKp44-Expression zu erwarten. Die fehlende NCR-Aktivierung bei gleichzeitiger Steigerung der IFN-gamma Produktion könnte durch eine zu kurze Cokultivierungszeit erklärt werden. Alternativ wäre auch eine Gegenregulation bzw. eine Erschöpfung der NK Zellen denkbar. Eine Erschöpfung der NK Zellen sowie anderer Immunzellen kommt meist durch eine permanente Exposition viraler oder neoplastischer Antigene zustande. Dieser Zustand zeichnet sich durch ein verändertes Expressionsmuster verschiedener aktivierender und inhibitorischer Rezeptoren sowie durch eine reduzierte Funktionalität der betroffenen Zellen aus (Schafer et al., 2015).

Die IFN-gamma Sekretion durch die NK Zellen spielt eine wichtige Rolle während der frühen Immunantwort bei Infektionen, stimuliert die Antigenpräsentation und steuert die Immunantwort in Richtung einer inflammatorischen T-Zellantwort, wodurch die Bekämpfung eingedrungener bakterieller Pathogene unterstützt wird (Robertson und Ritz, 1990). Eine weitere wichtige Aufgabe des IFN-gamma besteht in der Kontrolle und Inhibition des malignen Wachstums (Lee et al., 2000), indem es die Expression von MHC-I-Molekülen und MHC-II-Molekülen oder MHC-I verwandten Proteinen ULBP und MICA/MICB auf Tumorzellen steigert und die Angiogenese im Tumor hemmt (Yao et al., 1999).

In den vorliegenden Versuchen konnte eine signifikant höhere IFN-gamma Produktion in der Cokultur mit den Myelomzellen RPMI-8226 gemessen werden. Dies deutet trotz der verminderten Expression von NKG2D sowie der abgefallenen NK-Zellzahl auf eine NK-Zellaktivierung hin. Ein synergistischer Effekt mit den höchsten IFN-gamma Werten konnte ganz eindeutig in der Cokultur unter der Stimulation mit Interleukinen erreicht werden. Diese auf den ersten Blick kontroversen Ergebnisse mit der verminderten Expression von NKG2D und gleichzeitig einer gesteigerten IFN-gamma Sekretion lassen sich

möglicherweise durch die unterschiedlichen Zeitpunkte der verschiedenen aktivierenden und inhibierenden Abläufe bei den NK Zellen erklären. Alternativ wäre auch eine Erschöpfung der NK Zellen durch die Myelomzellexposition mit resultierender Reduktion der aktivierenden Rezeptoren denkbar. Längere Inkubationszeiten mit häufigeren Messungen der NK-Zellrezeptor-Expression einerseits und der IFN-gamma Produktion andererseits könnten das momentan scheinbar widersprüchliche Ergebnis durch Einfluss möglicher zeitlicher Faktoren aufklären.

4.2. Medikamentenwirkung

4.2.1. IMiDs Thalidomid und Lenalidomid

Thalidomid und sein Analogon Lenalidomid gehören zu der Klasse der IMiDs und werden u.a. zur Therapie des MM erfolgreich eingesetzt. Die in der Literatur beschriebenen unterschiedlichen immunmodulatorischen Wirkungen dieser Medikamente sind noch nicht vollständig verstanden und werfen einige Fragen auf. Eine der Hypothesen bezüglich eines unter der IMiD-Wirkung beobachteten Anstieges der NK-Zellzahl besagt, dass die Steigerung der NK-Zellzahl indirekt durch die IMiD-bedingte Aktivierung der T Zellen verursacht wird. T Zellen sezernieren unter der Behandlung mit IMiDs vermehrt IL 2, und das führt zur Steigerung der NK-Zellzahl (Davies et al., 2001). Die ausbleibende NK-Zellexpansion bei isolierten NK Zellen unter Lenalidomid konnte in der Studie von Dauguet nachgewiesen werden. Dort wurden, nach vorheriger NK-Zellisolation, lediglich NK Zellen mit Lenalidomid für 5 Tage inkubiert und anschließend die NK-Zellzahl, der Phänotyp und die Zytotoxizität der NK Zellen gemessen. Ein signifikanter Anstieg der NK-Zellzahl unter Lenalidomidbehandlung konnte nicht beobachtet werden (Dauguet et al., 2010). Lenalidomid scheint neben der erhöhten IL 2 Produktion durch die T Zellen auch die Expression der IL-2R-alpha-Kette auf den NK Zellen zu steigern. Die erhöhte IL 2 Sekretion und erhöhte IL-2R-alpha-Expression wiederum führen zur erhöhten Zytotoxizität durch die NK Zellen (Hsu et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte in der Cokultur unter den IMiDs ein minimaler Anstieg der prozentualen gesamten NK-Zellzahl sowie der reifen NK Zellen gemessen werden, wogegen es in der Cokultur ohne Medikamente zu einem signifikanten Rückgang der Zellzahl in der Gesamtpopulation der NK Zellen und in der reifen NK-Zellpopulation gekommen ist. Da in den vorliegenden Versuchen die NK Zellen nicht selektiert wurden,

kann die beobachtete Steigerung der NK-Zellzahl zum Teil durch die noch vorhandenen T Zellen, die bekanntermaßen durch IMiDs zur IL 2 Produktion angeregt werden, erklärt werden.

Eine jungst publizierte Studie konnte zeigen, dass die unterschiedlichen NK-Zellfunktionen wie die IFN-gamma Sekretion und Zytotoxizität zwar durch Lenalidomid gesteigert werden können, jedoch einen Trigger bzw. einen Verstärker (IL2, MICA, anti-CD16mAB) benötigen (Lagruet et al., 2015). Diese Studie unterstützt einerseits die Überlegung, dass die Myelomzelllinie RPMI-8226 als Trigger für die NK Zellen diene und die NK Zellen somit mit Hilfe von IMiDs geringfügig expandieren konnten. Folglich konnte der myelominduzierte, supprimierende Effekt auf die NK Zellen durch die IMiDs ansatzweise aufgehoben werden. Andererseits konnte in den hier durchgeführten Versuchen paradoxerweise eine deutliche Verminderung der IFN-gamma Produktion durch die NK Zellen in Cokultur unter IMiDs gemessen werden, während bei den NK Zellen ohne Cokultur keine relevante Veränderung der IFN-gamma Produktion unter IMiD-Behandlung festgestellt werden konnte.

Zum Lenalidomid-bedingten Effekt auf die IFN-gamma Sekretion durch die NK Zellen gibt es in der Literatur unterschiedliche und zum Teil kontroverse Angaben. Unter Lenalidomid konnte eine Beeinträchtigung der IFN-gamma Sekretion durch NK Zellen gesunder Probanden festgestellt werden (Dauguet et al., 2010). Allerdings wurden in dieser Studie die gereinigten NK Zellen nicht wie in den vorliegenden Versuchen für 24 Stunden, sondern für 5 Tage mit Lenalidomid inkubiert und erst anschließend die Messungen durchgeführt. Wiederum andere Studien konnten eine steigernde Wirkung auf die IFN-gamma Sekretion der NK Zellen durch Lenalidomid zeigen (Lagruet et al., 2015; Wu et al., 2008). Vermutlich tragen hier zum einen die unterschiedlichen Experimententwürfe zu den verschiedenen Ergebnissen bezüglich der IFN-gamma Produktion durch die NK Zellen bei. Zum anderen scheinen die Wirkungen zwischen IMiDs, Myelomzellen und Immunzellen so vielfältig und komplex zu sein, dass gleichzeitig immunaktivierende und antiinflammatorische, sogar immunsuppressive Effekte als Erklärung für die zum Teil widersprüchlichen Resultate denkbar wären.

Eine andere mögliche Erklärung beruht auf einer direkten antiproliferativen und apoptotischen Wirkung der IMiDs gegenüber den Myelomzellen (Hideshima et al., 2000; Tai et al., 2005). In der Cokultur ohne Medikamente werden die NK Zellen durch die

Myelomzellen, die als Trigger agieren, teilweise aktiviert, und es kommt zu einer vermehrten IFN-gamma Produktion durch die NK Zellen. Durch die Zugabe von IMiDs, werden die Myelomzellen vermehrt der Apoptose unterzogen. Möglicherweise führt diese Verminderung des Triggers (Myelomzellen) zur geringeren Aktivierung der NK Zellen und folglich zur verminderten IFN-gamma Produktion. Vermutlich würde sich ein anderer Effekt der IMiDs bezüglich der IFN-gamma Produktion zeigen, wenn die NK Zellen vor der Cokultivierung mit jeweils Thalidomid oder Lenalidomid inkubiert und erst anschließend mit der Myelomzelllinie RPMI-8226 kokultiviert worden wären.

Bezüglich der NK-Zellrezeptoren wurde bislang unter dem Einfluss von Lenalidomid eine Verminderung der Nkp46-Expression beschrieben, ohne dass jedoch ein deutlicher Verlust des zytotoxischen Potentials zu verzeichnen war (Dauguet et al., 2010). Ich konnte unter dem Einfluss von IMiDs keine signifikante Verminderung der Nkp46-Expression nach 24 Stunden Inkubationszeit feststellen, weder in der Cokultur noch im Ansatz NK Zellen allein. Möglicherweise spielten hier die unterschiedlich langen Inkubationszeiten (5 Tage versus 24 Stunden) eine Rolle.

Durch den Einfluss der Myelomzelllinie RPMI-8226 konnte in der Gesamtpopulation der NK Zellen ein beachtlicher Rückgang der NKG2D-Expression gemessen werden. Da es in den vorliegenden Versuchen durch die Zugabe von IMiDs zu keiner signifikanten Steigerung der NKG2D-Expression gekommen ist, ist davon auszugehen, dass der suppressive Effekt der Myelomzellen auf die NKG2D-Expression durch die IMiDs nicht aufgehoben werden konnte. Auch die anderen NK-Zellrezeptoren wurden durch die IMiDs nicht verändert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es durch die Behandlung mit IMiDs in der Cokultur mit Myelomzellen zu einer geringfügigen Steigerung der NK-Zellzahl kam, welche sonst unter dem Myelomeinfluss signifikant vermindert wurde. Eine Aktivierung der NK Zellen durch eine Behandlung mit IMiDs in Richtung Zytotoxizität (IFN-gamma, NKG2D, NCR) fand innerhalb von 24 Stunden nicht statt. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass die IMiDs den suppressiven Effekt durch die Myelomzellen *in vitro* allenfalls minimal über den geringfügigen Anstieg der NK-Zellzahl aufheben könnten.

4.2.2. Bortezomib

Bortezomib, ein selektiver und reversibler Proteasomeninhibitor (Armeanu et al., 2008; Hideshima et al., 2001), kann über viele direkte und indirekte Mechanismen sowohl Myelomzellen als auch NK Zellen beeinflussen. Über eine Bortezomib-bedingte Steigerung der NKG2D Liganden auf der Oberfläche der Tumorzellen (Jardine et al., 2012; Soriani et al., 2009) sowie eine verminderte Expression der MHC-Klasse I Proteine (Hallett et al., 2008; Shi et al., 2008) ist eine Aktivierung der NK Zellen denkbar. Es gibt jedoch auch Studien, die keine Änderung der MHC-Klasse I Proteine auf Tumorzellen unter Bortezomib feststellen konnten (Armeanu et al., 2008; Lundqvist et al., 2010). Interessanterweise scheint Bortezomib in niedrigen Dosierungen, zumindest in einigen Fällen, selektiv nur auf maligne Zellen zu wirken (Armeanu et al., 2008; Lundqvist et al., 2011). Armeanu et al. konnte nachweisen, dass im Gegensatz zu HCC-Zellen normale Leberzellen unter Bortezomib keinen Anstieg der MICA/B aufwiesen und somit auch der NK-Zellerkennung über NKG2D nicht zugänglich gemacht wurden (Armeanu et al., 2008).

Bortezomib wirkt jedoch nicht nur auf die unterschiedlichen Tumorzellen, sondern auch auf viele Zellen des Immunsystems. Mit Bortezomib behandelte, aktivierte NK Zellen konnten im Vergleich zu unbehandelten, aktivierten NK Zellen eine erhöhte Zytotoxizität gegen unterschiedliche Tumorzellen aufweisen (Lundqvist et al., 2010; Soriani et al., 2009).

Bortezomib scheint aber auch immunsuppressive Eigenschaften zu haben, welche vor allem in Korrelation mit der Wirkungsdauer und der zugeführten Dosis ansteigen (Wang et al., 2009). Unter Bortezomib wurde eine erhöhte apoptotische Wirkung auf ruhende NK Zellen sowie eine verminderte Expression des NKp46-Rezeptors und folglich auch eine erniedrigte Aktivität der NK Zellen beschrieben (Wang et al., 2009). Eine andere Arbeit berichtet über eine Abnahme der perforinunabhängigen Zytotoxizität unter Bortezomib bei aktivierten NK Zellen gegenüber den Myelomzellen (Feng et al., 2010).

Einen signifikanten Rückgang der NK Zellen, der reifen oder der unreifen NK Zellen konnte ich unter Bortezomib, im Gegensatz zu den Ergebnissen von Wang et al., weder in der Cokultur noch bei NK Zellen allein feststellen. Allenfalls zeigten sich unter Bortezomib im Trend deutlich niedrigere, aber nicht signifikante Werte der NK-Zellzahl. Eine signifikant reduzierte Expression des NKp46-Rezeptors konnte ebenfalls weder bei NK Zellen allein noch in der Cokultur ermittelt werden. In der Studie von Wang et al. wurden jedoch etwas höhere Bortezomib-Konzentrationen verwendet (4,7 ng/ml und 18,8 ng/ml) als in den

vorliegenden Versuchen (2 ng/ml). Da die Wirkungen des Bortezomibs sowohl dosis- als auch zeitabhängig sind (Wang et al., 2009) und die Konzentrationsangaben in vielen Studien zum Teil erheblich variieren (zwischen 1 nM und 1000 nM, entspricht 0,0384 ng/ml – 38,4 ng/ml), kommt es teilweise zu uneinheitlichen Ergebnissen bezüglich der Bortezomibwirkung auf die NK Zellen. Auch die Inkubationsdauer variierte in den unterschiedlichen Studien zwischen 12 und 48 Stunden (Blanco et al., 2006; Soriani et al., 2009; Lundqvist et al., 2010; Wang et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit konnte ich unter Bortezomib eine signifikante Suppression der NKG2D-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen ohne Cokultur feststellen. In der Cokultur mit Bortezomib wurde im Vergleich zur Cokultur ohne Medikamente keine zusätzliche suppressive Wirkung auf die NKG2D-Expression durch das Bortezomib ermittelt, ebenso wenig wie ein Anstieg der NKG2D-Expression. Des Weiteren konnte unter Bortezomib bei NK Zellen ohne Cokultur eine signifikante Verminderung der Nkp30-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen und den beiden Subpopulationen gemessen werden. Diese Ergebnisse sprechen ebenfalls für eine gewisse suppressive Wirkung auf die NK Zellen. Interessanterweise wurde unter der Behandlung mit Bortezomib eine suppressive Wirkung auch auf andere Immunzellen, z.B. T Zellen und DC, beschrieben. Diese immunsuppressive Eigenschaft wird zunehmend für die Prävention und Therapie der GvHD zu Nutze gemacht (Al-Homsi et al., 2016).

In mehreren Studien konnte ein negativer Effekt des Bortezomibs auch auf die IFN-gamma Sekretion durch NK Zellen und T Zellen belegt werden. Beispielsweise zeigt die Bortezomibdosis und die IFN-gamma Sekretion der T Lymphozyten eine inverse Korrelation. Unter bereits 100 nM (=3,84 ng/ml) Bortezomib konnte eine signifikant verminderte intrazelluläre IFN-gamma Expression bei den T Zellen gemessen werden (Blanco et al., 2006). Auch bei NK Zellen in Cokultur mit der Tumorzelllinie K562 konnte konzentrationsabhängig sogar bereits unter niedrigen Bortezomib-Dosierungen (5 nM) eine signifikante Verminderung der IFN-gamma Sekretion festgestellt werden (Armeanu et al., 2008). Im Gegensatz dazu konnte in den vorliegenden Versuchen kein signifikanter Einfluss des Bortezomibs auf die IFN-gamma Sekretion durch die NK Zellen, weder in der Cokultur noch bei NK Zellen allein, nachgewiesen werden.

Das zunehmende Verständnis der Interaktionen und der komplexen Mechanismen zwischen NK Zellen, Myelomzellen und den potenten gängigen Medikamenten

Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib kann zur Verbesserung der bereits bekannten immuntherapeutischen Verfahren und zur Entwicklung neuer immuntherapeutischer Strategien beitragen. Weitere Forschung wird auf diesem Gebiet nötig sein, um die genauen Mechanismen und Zusammenhänge zu entschlüsseln und das Immunsystem gegen die Myelomzellen weiter zu aktivieren.

5. Zusammenfassung

Eine Beeinträchtigung des Immunsystems durch Dysfunktion mehrerer Zellpopulationen, unter anderem der natürlichen Killerzellen trägt wesentlich zur Entstehung des Multiplen Myeloms bei. Zur Eliminierung von maligne transformierten Zellen werden die natürlichen Killerzellen über eine Reihe von verschiedenen Rezeptoren aktiviert. Im Gegenzug dazu haben Tumorzellen Mechanismen entwickelt, um der Immunantwort zu entkommen und diese zu hemmen. Die zur Behandlung des Multiplen Myeloms eingesetzten Medikamente Thalidomid, Lenalidomid und Bortezomib greifen einerseits in die Tumorescapemechanismen ein und verändern andererseits die Funktionen der Immunzellen.

Die vorliegende Arbeit untersuchte zum einen die Veränderung der natürlichen Killerzellen sowie deren Rezeptoren (NKG2A, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46) und Funktionalität unter dem Einfluss der Myelomzellen. Zum anderen wurden die Effekte von Thalidomid, Lenalidomid und Bortezomib auf die natürlichen Killerzellen ohne und mit der gleichzeitigen Wirkung der Myelomzellen erforscht. Dabei sollten die Fragen geklärt werden, ob sich die myelombedingten, immunsuppressiven Effekte bestätigen lassen, ob es Effekte der Medikamente auf die natürlichen Killerzellen gibt und ob die Medikamente die myelombedingten Effekte beeinflussen. Hierzu wurde die Anzahl der natürlichen Killerzellen bestimmt und deren reife und unreife Subpopulation, natürliche Killerzellrezeptoren sowie die Interferon-gamma Produktion am Durchflusszytometer gemessen. Diese Parameter wurden in Abhängigkeit von Anwesenheit / Abwesenheit von Myelomzellen und / oder Medikamenten bestimmt.

Durch die Myelomzellen konnte ein signifikanter Rückgang der natürlichen Killerzellen sowie eine verminderte NKG2D-Expression einerseits und gleichzeitig eine deutliche Zunahme der Interferon-gamma Antwort andererseits gemessen werden. Eine Aufhebung der myelombedingten Effekte auf die natürlichen Killerzellen konnte unter den getesteten Medikamenten nicht festgestellt werden. Vielmehr zeigten die natürlichen Killerzellen unter Thalidomid und Lenalidomid in der Cokultur mit Myelomzellen trotz wieder leicht gesteigener Zellzahl eine eingeschränkte Funktionalität durch verminderte Interferon-gamma Produktion im Vergleich zu unbehandelten natürlichen Killerzellen in Cokultur. Bortezomib übte über eine Verminderung der NKG2D- und NKp30-Expression eine suppressive Wirkung auf die natürlichen Killerzellen aus.

Zusammenfassend zeigten die vorliegenden Ergebnissen eine negative Beeinflussung der natürlichen Killerzellen durch Myelomzellen, die durch Thalidomid, Lenalidomid und Bortezomib nicht aufgehoben wurde.

6. Literaturverzeichnis

- Al-Homsi AS, Feng Y, Duffner U, Al Malki MM, Goodyke A, Cole K, Muilenburg M, Abdel-Mageed A. Bortezomib for the prevention and treatment of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol*. 2016; 44: 771-777
- Armeanu S, Krusch M, Baltz KM, Weiss TS, Smirnow I, Steinle A, Lauer UM, Bitzer M, Salih HR. Direct and natural killer cell-mediated antitumor effects of low-dose bortezomib in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 3520-3528
- Baier C, Fino A, Sanchez C, Farnault L, Rihet P, Kahn-Perles B, Costello RT. Natural killer cells modulation in hematological malignancies. *Front Immunol*. 2013; 4: 1-8
- Baume D, Robertson MJ, Levine H, Manley TJ, Schow PW, Ritz J. Differential responses to interleukin 2 define functionally distinct subsets of human natural killer cells. *Eur J Immunol*. 1992; 22: 1-6
- Baychelier F, Sennepin A, Ermonval M, Dorgham K, Debré P, Vieillard V. Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *Blood*. 2013; 122: 2935-2942
- Bernal M, Garrido P, Jimenez P, Carretero R, Almagro M, Lopez P, Navarro P, Garrido F, Ruiz-Cabello F. Changes in activatory and inhibitory natural killer (NK) receptors may induce progression to multiple myeloma: Implications for tumor evasion of T and NK cells. *Hum Immunol*. 2009; 70: 854-857
- Blanco B, Perez-Simon JA, Sanchez-Abarca LI, Carvajal-Vergara X, Mateos J, Vidriales B, Lopez-Holgado N, Maiso P, Alberca M, Villaron E, Schenkein D, Pandiella A, San Miguel J. Bortezomib induces selective depletion of alloreactive T lymphocytes and decreases the production of Th1 cytokines. *Blood*. 2006; 107: 3575-3583
- Bolzoni M, Storti P, Bonomini S, Todoerti K, Guasco D, Toscani D, Agnelli L, Neri A, Rizzoli V, Giuliani N. Immunomodulatory drugs lenalidomide and pomalidomide inhibit multiple myeloma-induced osteoclast formation and the RANKL/OPG ratio in the myeloma microenvironment targeting the expression of adhesion molecules. *Exp Hematol*. 2013; 41: 387-397

- Brandt CS, Baratin M, Yi EC, Kennedy J, Gao Z, Fox B, Haldeman B, Ostrander CD, Kaifu T, Chabannon C, Moretta A, West R, Xu W, Vivier E, Levin SD. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med*. 2009; 206: 1495-1503
- Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev*. 2006; 214: 73-91
- Butler JE, Moore MB, Presnell SR, Chan HW, Chalupny NJ, Lutz CT. Proteasome regulation of ULBP1 transcription. *J Immunol*. 2009; 182: 6600-6609
- Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 2008; 112: 461-469
- Caligiuri MA, Zmuidzinas A, Manley TJ, Levine H, Smith K, Ritz J. Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med*. 1990; 171: 1509-1526
- Campbell KS, Purdy AK. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology*. 2011; 132: 315-325
- Chang X, Zhu Y, Shi C, Stewart AK. Mechanism of immunomodulatory drugs' action in the treatment of multiple myeloma. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2014; 46: 240-253
- Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001; 22: 633-640
- Corral LG, Haslett PA, Muller GW, Chen R, Wong LM, Ocampo CJ, Patterson RT, Stirling DI, Kaplan G. Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF-alpha. *J Immunol*. 1999; 163: 380-386
- Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, Kubin M, Chalupny NJ. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*. 2001; 14: 123-133

Dauguet N, Fournie J, Poupot R, Poupot M. Lenalidomide downregulates the production of interferon-gamma and the expression of inhibitory cytotoxic receptors of human natural killer cells. *Cell Immunol.* 2010; 264: 163-170

Davies FE, Raje N, Hideshima T, Lentzsch S, Young G, Tai YT, Lin B, Podar K, Gupta D, Chauhan D, Treon SP, Richardson PG, Schlossman RL, Morgan GJ, Muller GW, Stirling DI, Anderson KC. Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood.* 2001; 98: 210-216

Delves PJ, Roitt IM. *Advances in immunology.* N Engl J Med. 2000; 343: 37-49

Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Therneau TM, Larson D, Benson J, Clark RJ, Melton LJ 3rd, Gertz MA, Kumar SK, Fonseca R, Jelinek DF, Rajkumar SV. Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Blood.* 2008; 111: 785-789

Ebert EC, Groh V. Dissection of spontaneous cytotoxicity by human intestinal intraepithelial lymphocytes: MIC on colon cancer triggers NKG2D-mediated lysis through Fas ligand. *Immunology.* 2008; 124: 33-41

Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood.* 2010; 115: 2167-2176

Fauriat C, Mallet F, Olive D, Costello RT. Impaired activated expression pattern in natural killer cells from patients with multiple myeloma. *Leukemia.* 2006; 20: 732-733

Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, Caligiuri MA. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood.* 2003; 101: 3052-3057

Feng X, Yan J, Wang Y, Zierath JR, Nordenskjöld M, Henter JI, Fadeel B, Zheng C. The proteasome inhibitor bortezomib disrupts tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression and natural killer (NK) cell killing of TRAIL receptor-positive multiple myeloma cells. *Mol Immunol.* 2010; 47: 2388-2396

Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature.* 2002; 419: 734-738

Halfteck GG, Elboim M, Gur C, Achdout H, Ghadially H, Mandelboim O. Enhanced in vivo growth of lymphoma tumors in the absence of the NK-activating receptor NKp46/NCR11. *J Immunol.* 2009; 182: 2221-2230

Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: Increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood.* 1998; 91: 3-21

Hallett WH, Ames E, Motarjemi M, Barao I, Shanker A, Tamang DL, Sayers TJ, Hudig D, Murphy WJ. Sensitization of tumor cells to NK cell-mediated killing by proteasome inhibition. *J Immunol.* 2008; 180: 163-170

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. World health organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: Report of the clinical advisory committee meeting- Airlie House, Virginia, November 1997. *Ann Oncol.* 1999; 17: 3835-3849

Hideshima T, Chauhan D, Hayashi T, Akiyama M, Mitsiades N, Mitsiades C, Podar K, Munshi NC, Richardson PG, Anderson KC. Proteasome inhibitor PS-341 abrogates IL-6 triggered signaling cascades via caspase dependent down regulation of gp130 in multiple myeloma. *Oncogene.* 2003a; 22: 8386-8393

Hideshima T, Chauhan D, Schlossman R, Richardson P, Anderson KC. The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. *Oncogene.* 2001; 20: 4519-4527

Hideshima T, Chauhan D, Shima Y, Raje N, Davies FE, Tai YT, Treon SP, Lin B, Schlossman RL, Richardson P, Muller G, Stirling DI, Anderson KC. Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. *Blood.* 2000; 96: 2943-2950

Hideshima T, Mitsiades C, Akiyama M, Hayashi T, Chauhan D, Richardson P, Schlossman R, Podar K, Munshi NC, Mitsiades N, Anderson KC. Molecular mechanisms mediating anti-myeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood.* 2003b; 101: 1530-1534

Hsu AK, Quach H, Tai T, Prince HM, Harrison SJ, Trapani JA, Smyth MJ, Neeson P, Ritchie DS. The immunostimulatory effect of lenalidomide on NK-cell function is profoundly inhibited by concurrent dexamethasone therapy. *Blood.* 2011; 117: 1605-1613

Hudspeth K, Silva-Santos B, Mavilio D. Natural cytotoxicity receptors: broader expression patterns and functions in innate and adaptive immune cells. *Front Immunol*. 2013; 4: 1-15

Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet*. 2000; 356: 1795-1799

International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol*. 2003; 121: 749-757

Jardine L, Hambleton S, Bigley V, Pagan S, Wang XN, Collin M. Sensitizing primary acute lymphoblastic leukemia to natural killer cell recognition by induction of NKG2D ligands. *Leuk Lymphoma*. 2012; 54: 167-173

Juelke K, Killig M, Luetke-Eversloh M, Parente E, Gruen J, Morandi B, Ferlazzo G, Thiel A, Schmitt-Knosalla I, Romagnani C. CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells. *Blood*. 2010; 116: 1299-1307

Krieg S, Ullrich E. Novel immune modulators used in hematology: impact on NK cells. *Front Immunol*. 2013; 3: 1-10

Kumar SK, Mikhael JR, Buadi FK, Dingli D, Dispenzieri A, Fonseca R, Gertz MA, Greipp PR, Hayman SR, Kyle RA, Lacy MQ, Lust JA, Reeder CB, Roy V, Russell SJ, Short KE, Stewart AK, Witzig TE, Zeldenrust SR, Dalton RJ, Rajkumar SV, Bergsagel PL. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Consensus Guidelines. *Mayo Clin Proc*. 2009 December; 84: 1095-1110

Kyle RA. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. Natural history in 241 cases. *Am J Med*. 1978; 64: 814-826

Kyle RA. Multiple Myeloma: an odyssey of discovery. *Br J Haematol*. 2000; 111: 1035-1044

Kyle RA, Durie BGM, Rajkumar SV, Landgren O, Blade J, Merlini G, Kröger N, Einsele H, Vesole DH, Dimopoulos M, San-Miguel J, Avet-Loiseau H, Hajek R, Chen WM, Anderson KC, Ludwig H, Sonneveld P, Pavlovsky S, Palumbo A, Richardson PG, Barlogie B, Greipp P, Vescio R, Turesson I, Westin J, Boccadoro M, on behalf of the International Myeloma Working Group. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia*. 2010; 24: 1121-1127

Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple Myeloma. *Blood*. 2008; 111: 2962-2972

Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ 3rd. A long-term study of prognosis of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*. 2002; 346: 564-569

Laguerre K, Carisey A, Morgan DJ, Chopra R, Davis DM. Lenalidomide augments actin remodeling and lowers NK-cell activation thresholds. *Blood*. 2015; 126: 50-60

Landgren O, Gridley G, Turesson I, Caporaso NE, Goldin LR, Baris D, Fears TR, Hoover RN, Linet MS. Risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and subsequent multiple myeloma among African American and white veterans in the United States. *Blood*. 2006; 107: 904-906

Landgren O, Kyle AR, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, Dispenzieri A, Kumar S, Clark RJ, Baris D, Hoover R, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*. 2009; 113: 5412-5417

Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*. 1986; 136: 4480-4486

Lee JK, Sayers TJ, Brooks AD, Back TC, Young HA, Komschlies KL, Wigginton JM, Wiltrot RH. IFN-gamma-dependent delay of in vivo tumor progression by Fas overexpression on murine renal cancer cells. *J Immunol*. 2000; 164: 231-239

Li Y, Mariuzza RA. Structural basis for recognition of cellular and viral ligands by NK cell receptors. *Front Immunol.* 2014; 5: 1-20

Lioznov M, El-Cheikh JJr, Hoffmann F, Hildebrandt Y, Ayuk F, Wolschke C, Atanackovic D, Schilling G, Badbaran A, Bacher U, Fehse B, Zander AR, Blaise D, Mohty M, Kröger N. Lenalidomide as salvage therapy after allo-SCT for multiple myeloma is effective and leads to an increase of activated NK (NKp44+) and T (HLA-DR+) cells. *Bone Marrow Transplant.* 2010; 45: 349-353

Lu ZY, Zhang XG, Rodriguez C, Wijdenes J, Gu ZJ, Morel-Fournier B, Harousseau JL, Bataille R, Rossi JF, Klein B. Interleukin-10 is a proliferation factor but not a differentiation factor for human myeloma cells. *Blood.* 1995; 85: 2521-2527

Lundqvist A, Abrams SI, Schrump DS, Alvarez G, Suffredini D, Berg M, Childs R. Bortezomib and depsipeptide sensitize tumors to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: a novel method to potentiate natural killer cell tumor cytotoxicity. *Cancer Res.* 2006; 66: 7317-7325

Lundqvist A, Berg M, Smith A, Childs RW. Bortezomib treatment to potentiate the anti-tumor immunity of ex-vivo expanded adoptively infused autologous natural killer cells. *J Cancer.* 2011; 2: 383-385

Lundqvist A, Su S, Rao S, Childs R. Cutting edge: bortezomib-treated tumors sensitized to NK cell apoptosis paradoxically acquire resistance to antigen-specific T cells. *J Immunol.* 2010; 184: 1139-1142

Mirjagic Martinovic KM, Babovic N Lj, Dzodic RR, Jurisic VB, Tanic NT, Konjevic GM. Decreased expression of NKG2D, NKp46, DNAM-1 receptors, and intracellular perforin and STAT-1 effector molecules in NK cells and their dim and bright subsets in metastatic melanoma patients. *Melanoma Res.* 2014; 24: 295-304

Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19: 197-223

Moretta A, Parolini S, Castriconi R, Bottino C, Vitale M, Sivori S, Millo R. Function and specificity of human natural killer cell receptors. *Eur J Immunogenet.* 1997; 24: 455-468

Moretta L. Dissecting CD56dim human NK cells. *Blood*. 2010; 116: 3689-3691

Pessoa de Magalhaes RJ, Vidriales MB, Paiva B, Fernandez-Gimenez C, Garcia-Sanz R, Mateos MV, Gutierrez NC, Lecomte Q, Blanco JF, Hernandez J, de las Heras N, Martinez-Lopez J, Roig M, Costa ES, Ocio ME, Perez-Andres M, Maiolino A, Nucci M, De La Rubia J, Lahuerta JJ, San-Miguel JF, Orfao A. Analysis of the immune system of multiple myeloma patients achieving long-term disease control by multidimensional flow cytometry. *Haematologica*. 2013; 98: 79-86

Peter ME, Hadji A, Murmann AE, Brockway S, Putzbach W, Pattanayak A, Ceppi P. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell Death Differ*. 2015; 22: 549-555

Pogge von Strandmann E, Simhadri VR, von Tresckow B, Sasse S, Reiners KS, Hansen HP, Rothe A, Böll B, Simhadri VL, Borchmann P, McKinnon PJ, Hallek M, Engert A. Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the Nkp30 receptor on natural killer cells. *Immunity*. 2007; 27: 965-974

Rajkumar SV. Thalidomide: tragic past and promising future. *Mayo Clin Proc*. 2004; 79: 899-903

Rajkumar SV, Lacy MQ, Kyle RA. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Blood Rev*. 2007; 21: 255-265

Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. Bortezomib (PS-341): a novel, first-in-class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers. *Cancer Control*. 2003; 10: 361-369

Richardson PG, Schlossman RL, Weller E, Hideshima T, Mitsiades C, Davies F, LeBlanc R, Catley LP, Doss D, Kelly K, McKenney M, Mechlowsky J, Freeman A, Deocampo R, Rich R, Ryoo JJ, Chauhan D, Balinski K, Zeldis J, Anderson KC. Immunomodulatory drug CC-5013 overcomes drug resistance and is well tolerated in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood*. 2002; 100: 3063-3067

Robertson MJ, Ritz J. Biology and relevance of human natural killer cells. *Blood*. 1990; 76: 2421-2438

Schafer JL, Müller-Trutwin MC, Reeves RK. NK cell exhaustion: bad news for chronic disease? *Oncotarget*. 2015; 6: 21797-21798

Sakamaki I, Kwak LW, Cha SC, Yi Q, Lerman B, Chen J, Surapaneni S, Bateman S, Qin H. Lenalidomide enhances the protective effect of a therapeutic vaccine and reverses immune suppression in mice bearing established lymphomas. *Leukemia*. 2014; 28: 329-337

Semeraro M, Vacchelli E, Eggermont A, Galon J, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L. Trial Watch: Lenalidomide-based immunochemotherapy. *Oncoimmunology*. 2013; 2(11): e26494

Sharma RA, Steward WP, Daines CA, Knight RD, O'Byrne KJ, Dalglish AG. Toxicity profile of the immunomodulatory thalidomide analogue, lenalidomide: phase I clinical trial of three dosing schedules in patients with solid malignancies. *Eur J Cancer*. 2006; 42: 2318-2325

Shi J, Tricot GJ, Malaviarachchi PA, Szmania SM, Kellum RE, Storrie B, Mulder A, Shaughnessy JD Jr, Barlogie B, van Rhee F. Bortezomib downregulates the cell-surface expression of HLA class I and enhances natural killer cell-mediated lysis of myeloma. *Blood*. 2008; 111: 1309-1317

Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, Munshi N, Anaissie E, Wilson C, Dhodapkar M, Zeddis J, Barlogie B. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*. 1999; 341: 1565-1571

Sivori S, Vitale M, Morelli L, Sanseverino L, Augugliaro R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J. Exp. Med*. 1997; 186: 1129-1136

Soriani A, Zingoni A, Cerboni C, Iannitto ML, Ricciardi MR, Di Gialleonardo V, Cippitelli M, Fionda C, Petrucci MT, Guarini A, Foà R, Santoni A. ATM-ATR-dependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells by therapeutic agents results in enhanced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype. *Blood*. 2009; 113: 3503-3511

Strasser K, Ludwig H. Thalidomide treatment in multiple myeloma. *Blood Rev*. 2002; 16: 207-215

Tai YT, Li XF, Catley L, Coffey R, Breitkreutz I, Bae J, Song W, Podar K, Hideshima T, Chauhan D, Schlossman R, Richardson P, Treon SP, Grewal IS, Munshi NC, Anderson KC. Immunomodulatory Drug Lenalidomide (CC-5013, IMiD3) augments anti-CD40 SGN-40-induced cytotoxicity in human multiple myeloma: clinical implications. *Cancer Res.* 2005; 65: 11712-11720

Vieillard V, Baychelier F, Debré P. NKp44L: A new tool for fighting cancer. *Oncoimmunology.* 2014; 3: e27988-1-e27988-2

Villunger A, Egle A, Marschitz I, Kos M, Böck G, Ludwig H, Geley S, Kofler R, Greil R. Constitutive expression of Fas (CD95/APO-1) ligand on multiple myeloma cells: A potential mechanism of tumour-induced suppression of immune surveillance. *Blood.* 1997; 90: 12-20

Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E, Augugliaro R, Moretta L, Moretta A. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med.* 1998; 187: 2065-2072

von Lilienfeld-Toal M, Frank S, Leyendecker C, Feyler S, Jarmin S, Morgan R, Glasmacher A, Märten A, Schmidt-Wolf IG, Brossart P, Cook G. Reduced immune effector cell NKG2D expression and increased levels of soluble NKG2D ligands in multiple myeloma may not be causally linked. *Cancer Immunol Immunother.* 2010; 59: 829-839

Wang X, Ottosson A, Ji C, Feng X, Nordenskjöld M, Henter JI, Fadeel B, Zheng C. Proteasome inhibition induces apoptosis in primary human natural killer cells and suppresses NKp46-mediated cytotoxicity. *Haematologica.* 2009; 94: 470-478

Wiesmayr S, Webber SA, Macedo C, Popescu J, Smith L, Luce J, Metes D. Decreased NKp46 and NKG2D and elevated PD-1 are associated with altered NK-cell function in pediatric transplant patients with PTLD. *Eur J Immunol.* 2012; 42: 541-550

Wu L, Adams M, Carter T, Chen R, Muller G, Stirling D, Schafer P, Bartlett JB. Lenalidomide enhances natural killer cell and monocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-treated CD20+ tumor cells. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 4650-4657

Yao L, Sgadari C, Furuke K, Bloom ET, Teruya-Feldstein J, Tosato G. Contribution of natural killer cells to inhibition of angiogenesis by interleukin-12. *Blood*. 1999; 93: 1612-1621

Zhu D, Corral LG, Fleming YW, Stein B. Immunomodulatory drugs Revlimid (lenalidomide) and CC-4047 induce apoptosis of both hematological and solid tumor cells through NK cell activation. *Cancer Immunol Immunother*. 2008; 57: 1849-1859

Zilka A, Landau G, HersHKovitz O, Bloushtain N, Bar-Ilán A, Benchetrit F, Fima E, van Kuppevelt TH, Gallagher JT, Elgavish S, Porgador A. Characterization of the heparin/heparan sulfate binding site of the natural cytotoxicity receptor NKp46. *Biochemistry*. 2005; 44: 14477-14485

7. Anhang

Abbildungen zum Kapitel 3.1.2

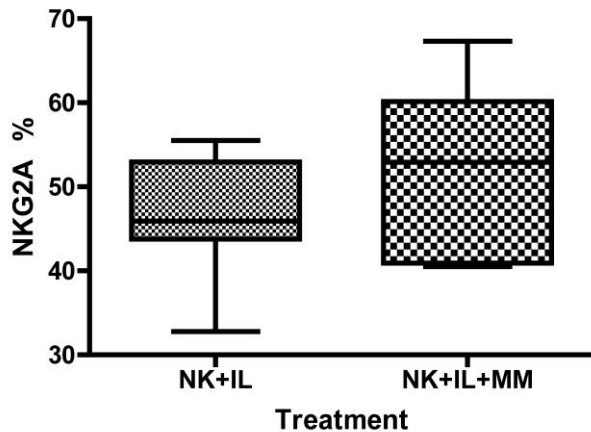


Abb. 19: Durchflusszytometrische Untersuchung von NKG2A-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen unter dem Einfluss der Myelomzellen RPMI-8226, dargestellt in Prozent. Vergleich zwischen NK Zellen allein bzw. Kokultur mit Interleukinen. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median NK Zellen allein: 45,9 % (IQR 43,8-53), Median Kokultur: 53 % (IQR 41-60), $p=0,7$, $n=5$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,0125$).

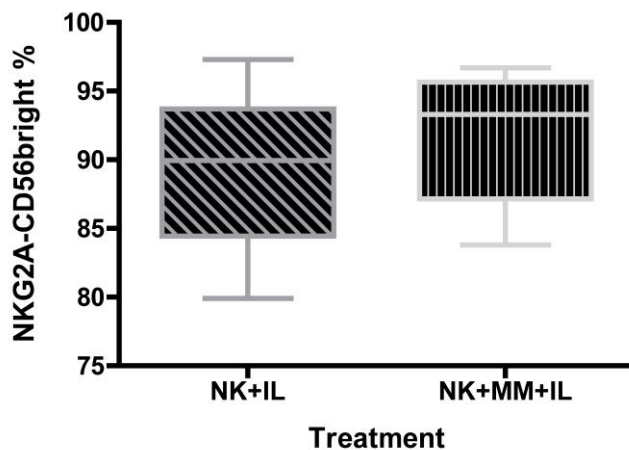


Abb. 20: Durchflusszytometrische Untersuchung von NKG2A-Expression in der unreifen NK-Zellpopulation unter dem Einfluss der Myelomzellen RPMI-8226, dargestellt in Prozent. Vergleich zwischen NK Zellen allein bzw. Kokultur mit Interleukinen. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median NK Zellen allein: 90 % (IQR 84,5-93,7), Median Kokultur: 93,3 % (IQR 87-95,7), $p=0,44$, $n=5$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,0125$).

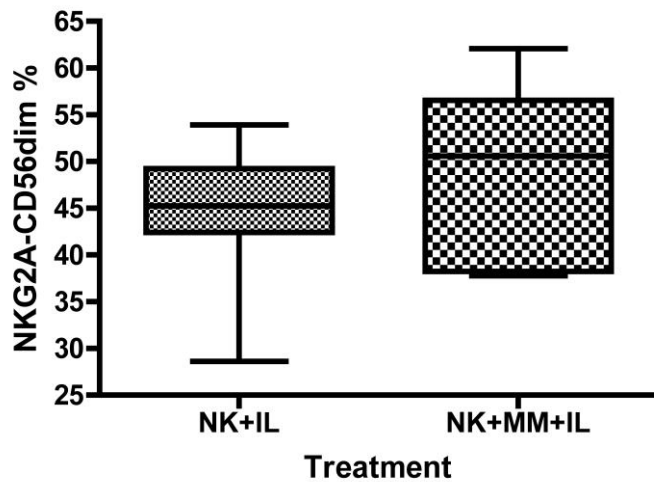


Abb. 21: Durchflusszytometrische Untersuchung von NKG2A-Expression in der reifen NK-Zellpopulation unter dem Einfluss der Myelomzellen RPMI-8226, dargestellt in Prozent. Vergleich zwischen NK Zellen allein bzw. Kokultur mit Interleukinen. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median NK Zellen allein: 45,3 % (IQR 42,4-49,3), Median Kokultur: 50,6 % (IQR 38,3-56,6), $p=0,8$, $n=5$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,0125$).

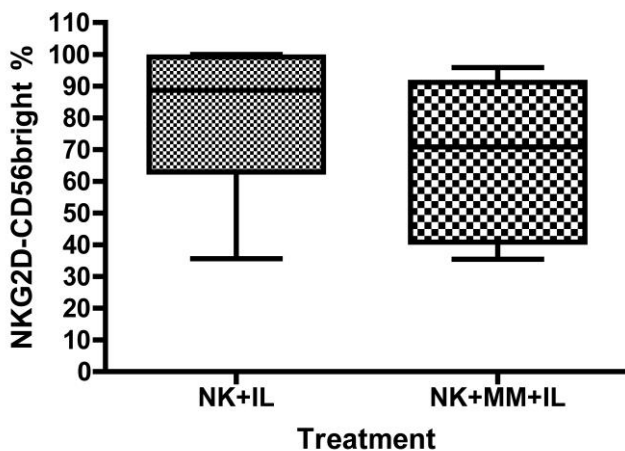


Abb. 22: Durchflusszytometrische Untersuchung von NKG2D-Expression in der unreifen NK-Zellpopulation unter dem Einfluss der Myelomzellen RPMI-8226, dargestellt in Prozent. Vergleich zwischen NK Zellen allein bzw. Kokultur mit Interleukinen. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median NK Zellen allein: 88,7 % (IQR 62,9-99,1), Median Kokultur: 70,8 % (IQR 40,8-91,2), $p=0,25$, $n=5$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,0125$).

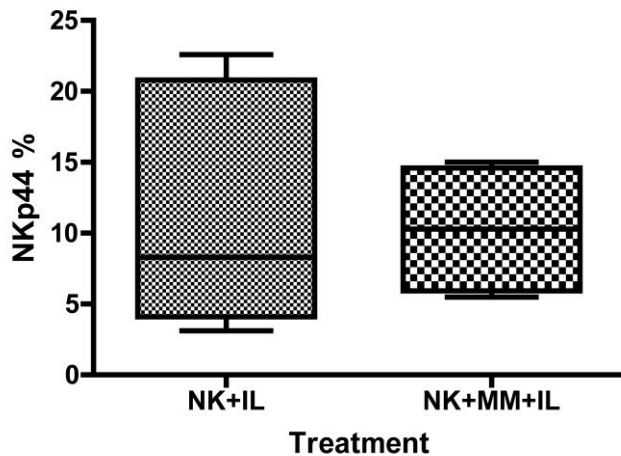


Abb. 23: Durchflusszytometrische Untersuchung von NKp44-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen unter dem Einfluss der Myelomzellen RPMI-8226, dargestellt in Prozent. Vergleich zwischen NK Zellen allein bzw. Kokultur mit Interleukinen. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median NK Zellen allein: 8,3 % (IQR 4,1-20,8), Median Kokultur: 10,3 % (IQR 5,7-14,8), $p=0,9$, $n=5$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,0125$).

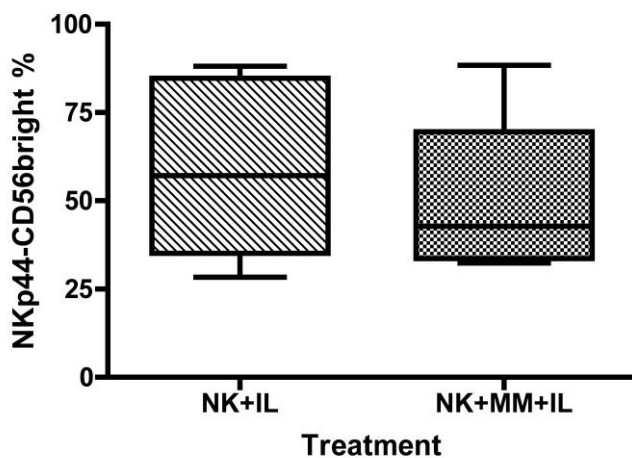


Abb. 24: Durchflusszytometrische Untersuchung von NKp44-Expression in der unreifen NK-Zellpopulation unter dem Einfluss der Myelomzellen RPMI-8226, dargestellt in Prozent. Vergleich zwischen NK Zellen allein bzw. Kokultur mit Interleukinen. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median NK Zellen allein: 57,1 % (IQR 38,5-83), Median Kokultur: 42,8 % (IQR 33,5-70), $p=0,6$, $n=5$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,0125$).

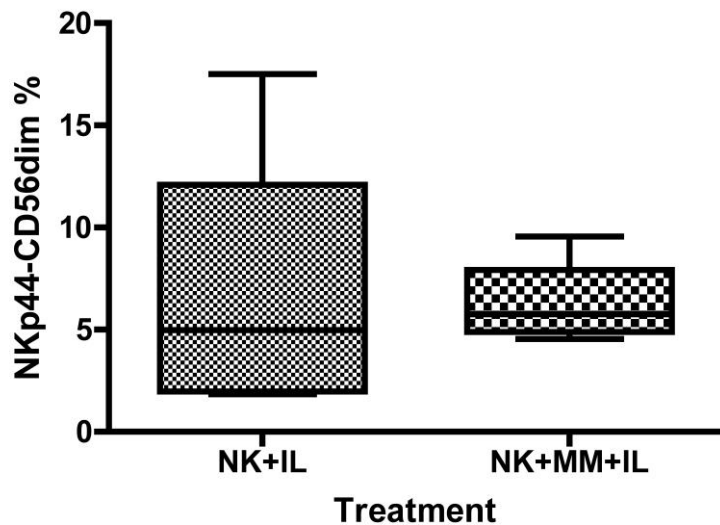


Abb. 25: Durchflusszytometrische Untersuchung von NKp44-Expression in der reifen NK-Zellpopulation unter dem Einfluss der Myelomzellen RPMI-8226, dargestellt in Prozent. Vergleich zwischen NK Zellen allein bzw. Kokultur mit Interleukinen. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median NK Zellen allein: 5 % (IQR 1,98-12,1), Median Kokultur: 5,8 % (IQR 4,8-8), $p=0,7$, $n=5$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,0125$).

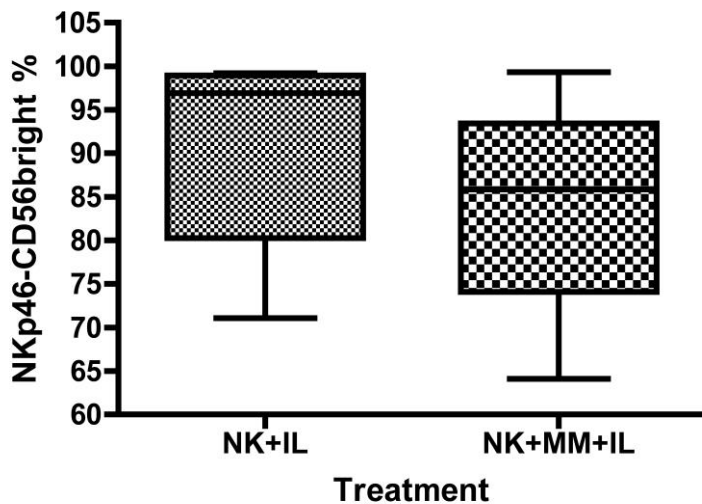


Abb. 26: Durchflusszytometrische Untersuchung von NKp46-Expression in der unreifen NK-Zellpopulation unter dem Einfluss der Myelomzellen RPMI-8226, dargestellt in Prozent. Vergleich zwischen NK Zellen allein bzw. Kokultur mit Interleukinen. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median NK Zellen allein: 96,9 % (IQR 80,3-98,95), Median Kokultur: 85,9 % (IQR 74-93,5), $p=0,17$, $n=5$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,0125$).

Abbildungen zum Kapitel 3.2.2

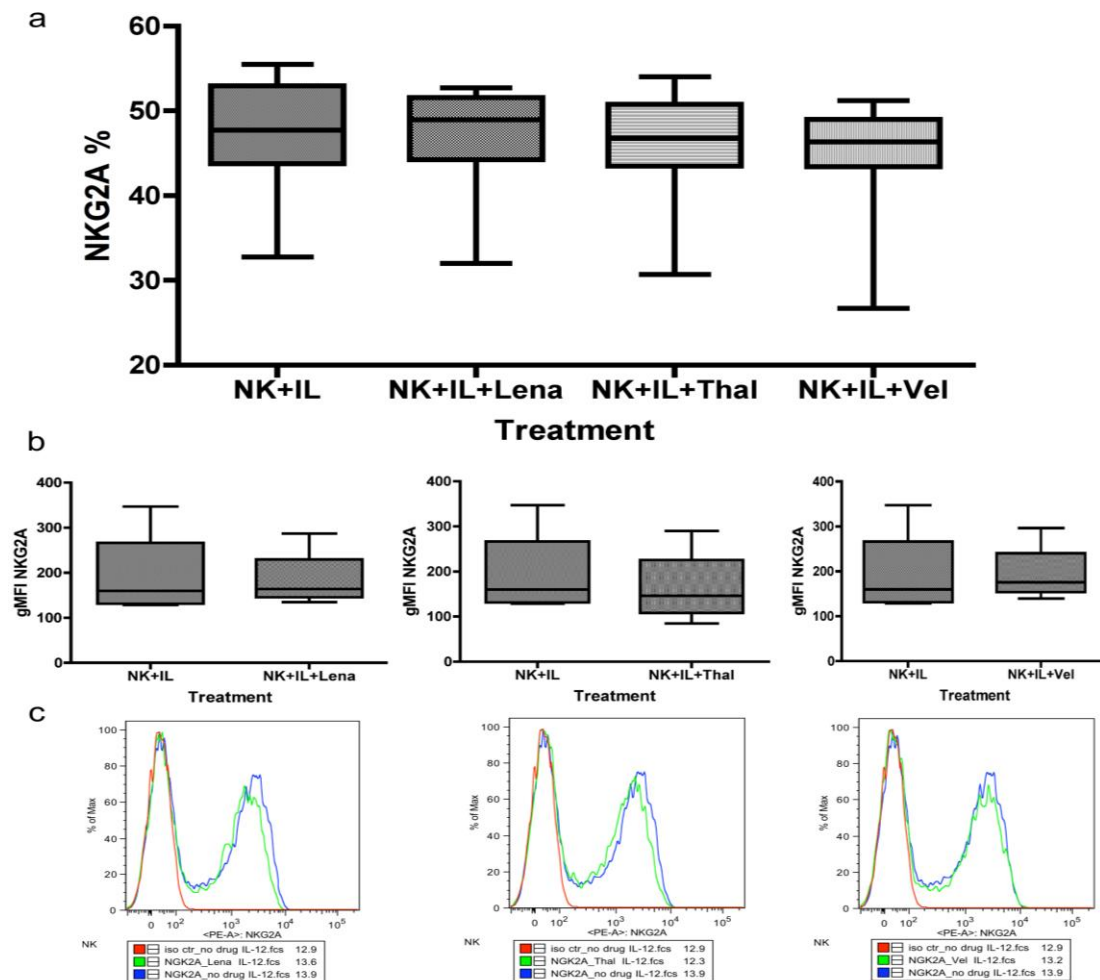


Abb. 27: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKG2A-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen, dargestellt in Prozent, dazu die Antigenexpression von NKG2A als gMFI unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall.

a) Median kein Medikament: 47,70 % (IQR 43.70-53.83), Median Lenalidomid: 48.95 % (IQR 44.08-52.10), $p=0,69$, Median Thalidomid: 46.80 % (IQR 43.25-51.70), $p=0,011$, Median Bortezomib: 46,35 % (IQR 43.2-49,5), $p=0,06$, $n=7$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,01$).

b) Vergleich der Dichte des NKG2A-Rezeptors, dargestellt als gMFI, zwischen NK Zellen behandelt mit Interleukinen bzw. NK Zellen behandelt mit Interleukinen und Medikamenten. Median kein Medikament: 159,8 (IQR 129,9-268), Median Lenalidomid: 163,9 (IQR 143-229), $p=0,57$, Median Thalidomid: 146 (IQR 108-225), $p=0,096$, Median Bortezomib: 175,9 (IQR 152,5-240), $p=0,93$, $n=4$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,01$).

c) Exemplarisches Histogramm mit anti-Maus IgG gefärbten NK Zellen als Isotypkontrolle (rote Kurve), NK Zellen mit Interleukinbehandlung (blaue Kurve) und NK Zellen mit Interleukinen und jeweils Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib (grüne Kurve).

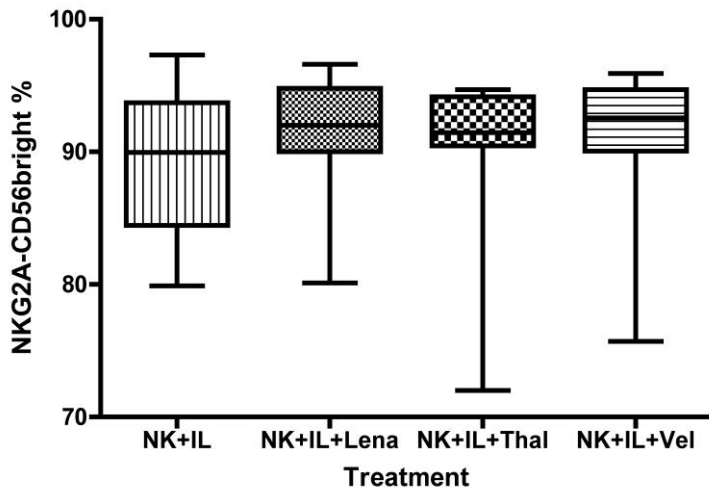


Abb. 28: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKG2A-Expression bei unreifen NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 89,95 % (IQR 84,45-93,7), Median Lenalidomid: 92 % (IQR 90-94,8), $p=0,16$, Median Thalidomid 91,5 % (IQR 90,5-94,2), $p=0,72$, Median Bortezomib 92,8 % (IQR 91,1-95,6), $p=0,5$, $n=7$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,01$).

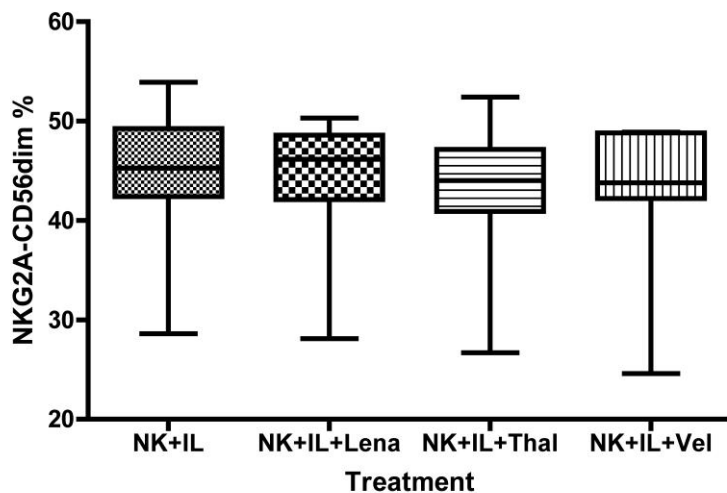


Abb. 29: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKG2A-Expression bei reifen NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 45,3 % (IQR 42,4-49,3), Median Lenalidomid: 46,2 % (IQR 42,1-48,6), $p=0,5$, Median Thalidomid 44 % (IQR 41-47,2), $p=0,003$, Median Bortezomib 43,8 % (IQR 42,2-48,8), $p=0,3$, $n=7$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,01$).

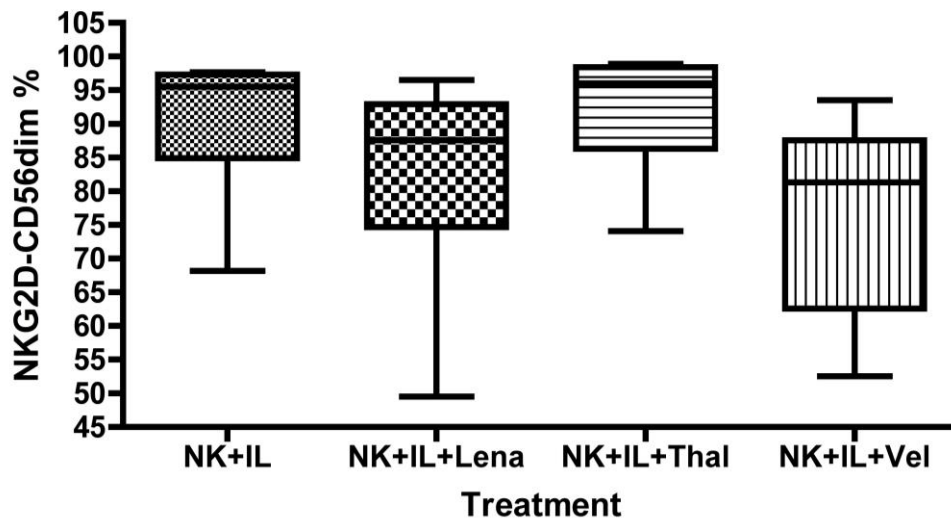


Abb. 30: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKG2D-Expression bei reifen NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 95,5 % (IQR 84,9-97,3), Median Lenalidomid: 87,6 % (IQR 74,7-92,9), $p=0,024$, Median Thalidomid 96 % (IQR 86,3-98,4), $p=0,23$, Median Bortezomib 81,3 % (IQR 63-86,5), $p=0,0125$, $n=6$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,01$).

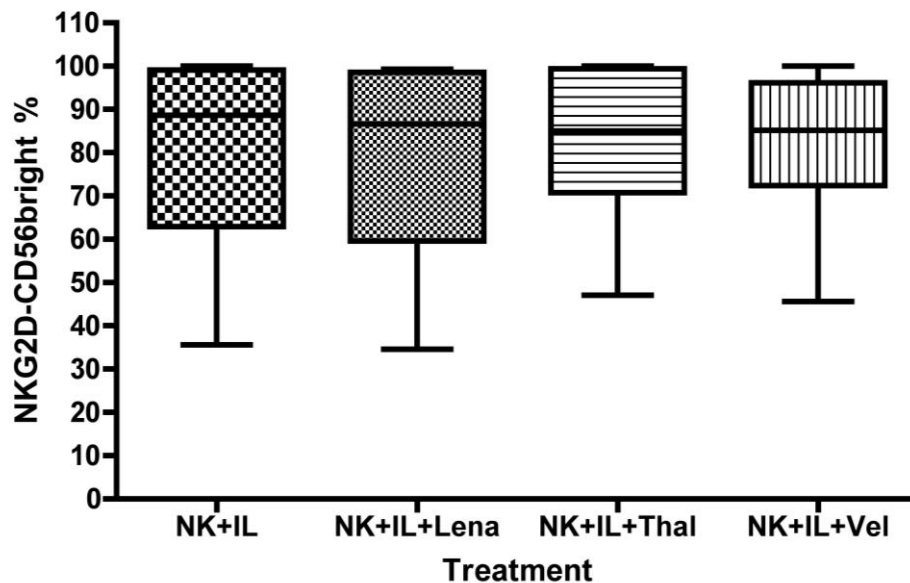


Abb. 31: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKG2D-Expression bei unreifen NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 88,7 % (IQR 62,9-99,1), Median Lenalidomid: 86,6 % (IQR 59,6-98,6), $p=0,3$, Median Thalidomid 85 % (IQR 70,8-99,4), $p=0,26$, Median Bortezomib 85,2 % (IQR 72,4-96,1), $p=0,4$, $n=6$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,01$).

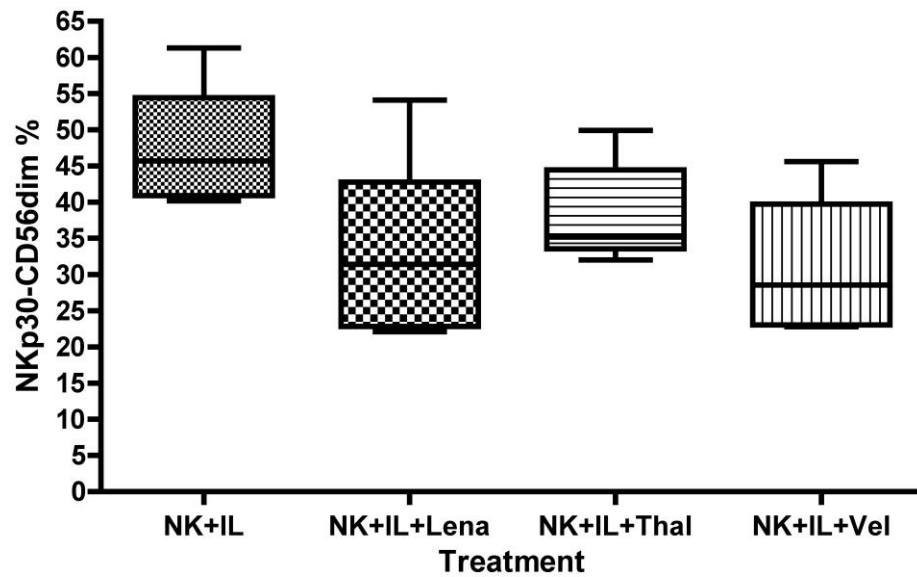


Abb. 32: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp30-Expression bei reifen NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 45,7 % (IQR 40,9-54,45), Median Lenalidomid: 31,4 % (IQR 22,85-42,75), $p=0,011$, Median Thalidomid 35,2 % (IQR 33,55-44,45), $p=0,021$, Median Bortezomib 28,55 % (IQR 22,93-42,65), $p=0,015$, $n=4$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,01$).

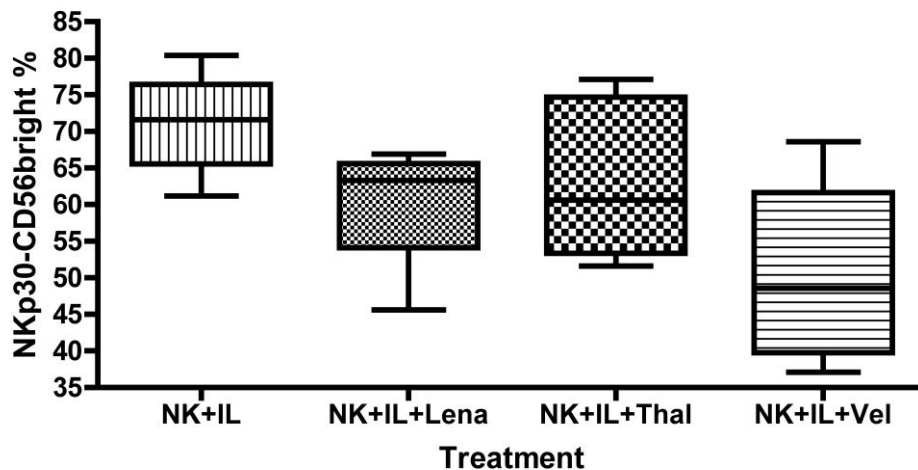


Abb. 33: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp30-Expression bei unreifen NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 71,6 % (IQR 65,6-76,5), Median Lenalidomid: 63,3 % (IQR 54,1-65,6), $p=0,014$, Median Thalidomid 60,6 % (IQR 53,4-74,7), $p=0,08$, Median Bortezomib 51,0 % (IQR 39,8-61,7), $p=0,14$, $n=4$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,01$).

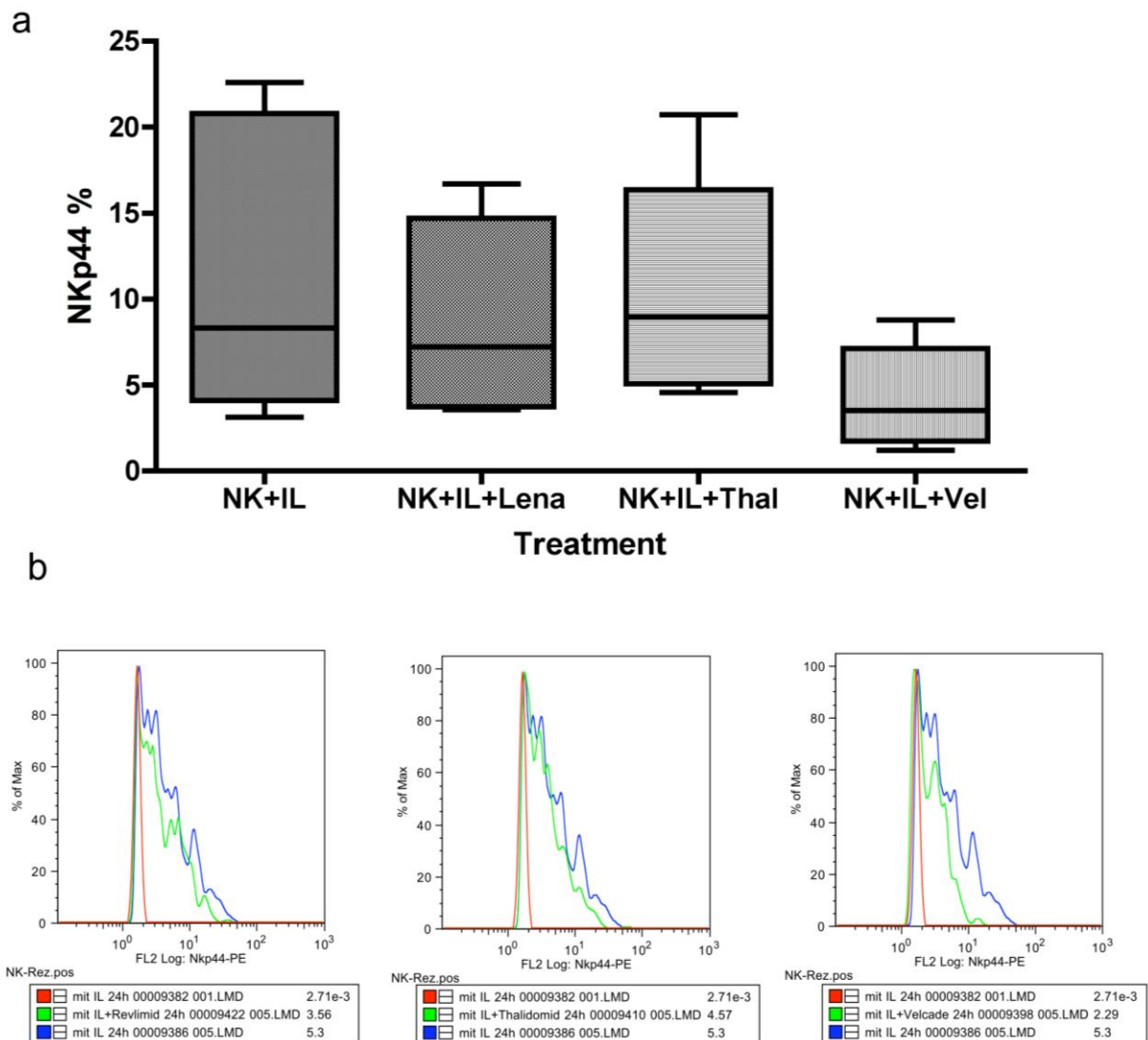


Abb. 34: a) Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp44-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 8,3 % (IQR 4,1-20,8), Median Lenalidomid: 7,23 % (IQR 3,7-14,7), $p=0,096$, Median Thalidomid 8,95 % (IQR 5,1-16,4), $p=0,5$, Median Bortezomib 3,5 % (IQR 1,7-7,1), $p=0,16$, $n=5$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,01$).

b) Exemplarisches Histogramm mit anti-Maus IgG gefärbten NK Zellen als Isotypkontrolle (rote Kurve), NK Zellen mit Interleukinbehandlung (blaue Kurve) und NK Zellen mit Interleukinen und jeweils Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib (grüne Kurve).

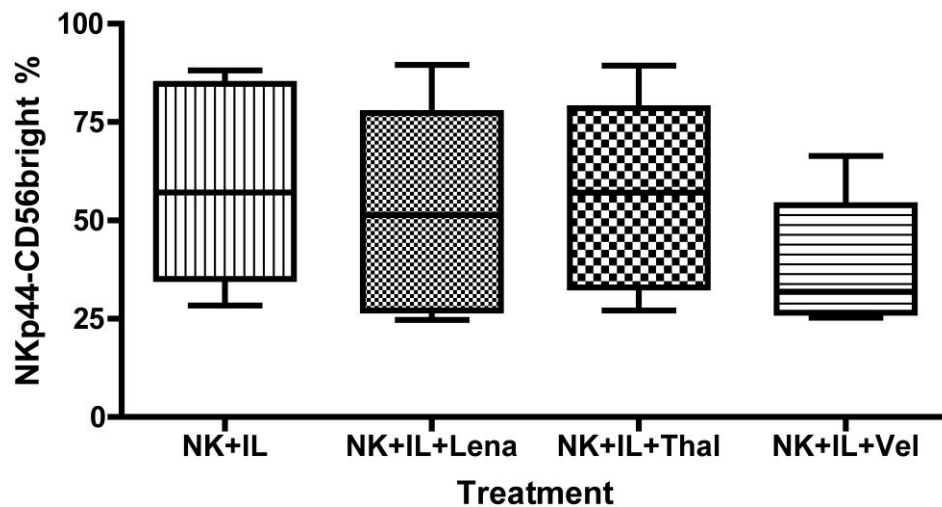


Abb. 35: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp44-Expression bei unreifen NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 57,1 % (IQR 38,5-83), Median Lenalidomid: 51,4 % (IQR 28,3-71,1), $p=0,06$, Median Thalidomid 57,0 % (IQR 35,9-73,1), $p=0,4$, Median Bortezomib 36,6 % (IQR 27,2-52,5), $p=0,02$, $n=5$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,01$).

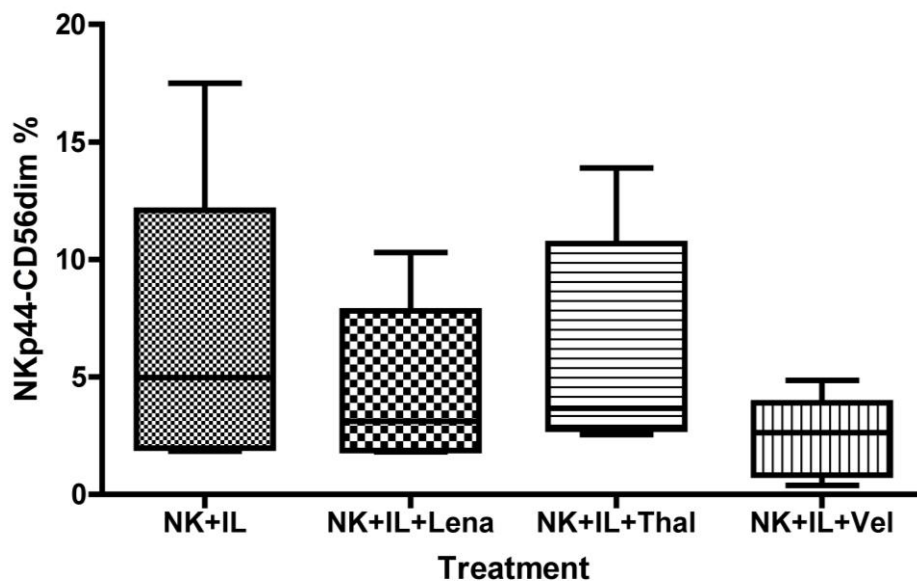


Abb. 36: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp44-Expression bei reifen NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 4,97 % (IQR 1,98-12,1), Median Lenalidomid: 3,1 % (IQR 1,9-7,8), $p=0,16$, Median Thalidomid: 3,7 % (IQR 2,8-10,7), $p=0,5$, Median Bortezomib 2,6 % (IQR 0,8-3,9), $p=0,2$, $n=5$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,01$).

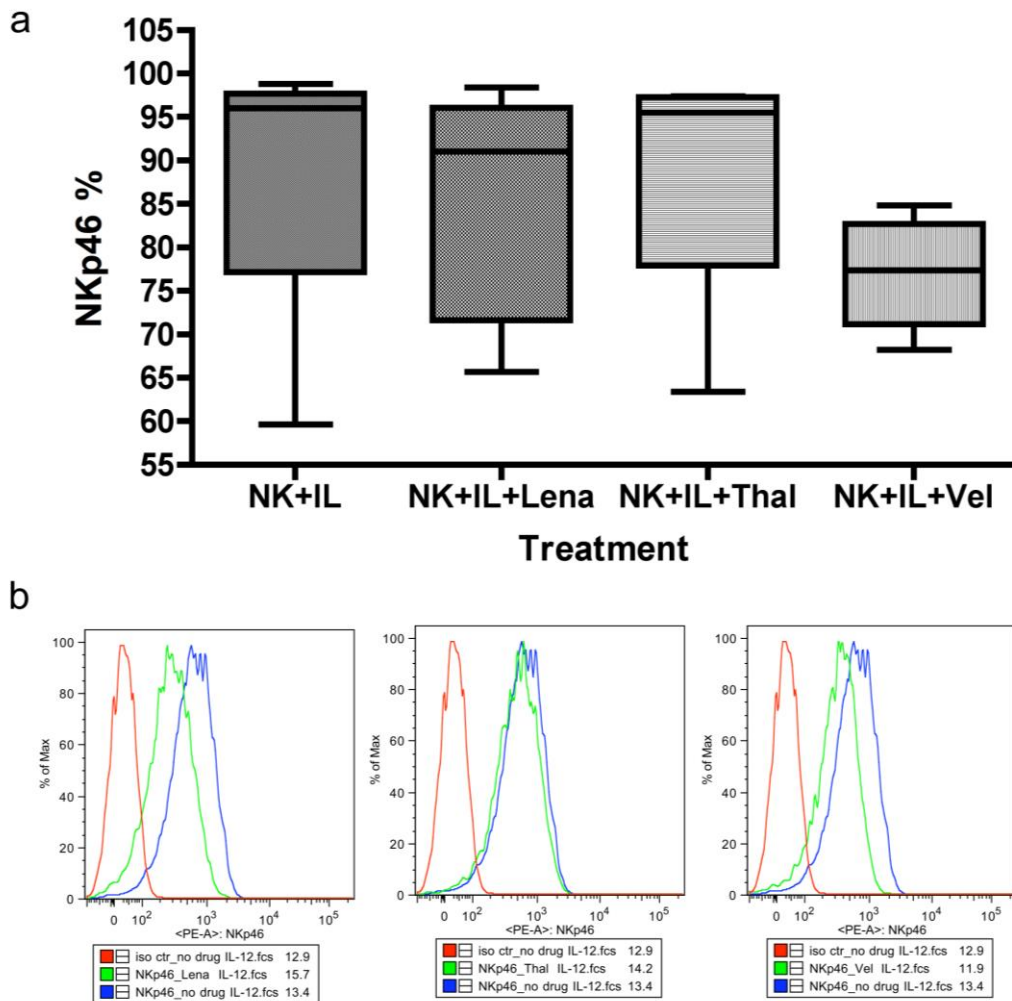


Abb. 37: a) Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp46-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 96 % (IQR 85,9-97,2), Median Lenalidomid: 91 % (IQR 74,6-94,9), $p=0,25$, Median Thalidomid 95,5 % (IQR 85,2-97,2), $p=0,96$, Median Bortezomib 77,4 % (IQR 72,7-81,7), $p=0,04$, $n=5$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,01$).

b) Exemplarisches Histogramm mit anti-Maus IgG gefärbten NK Zellen als Isotypkontrolle (rote Kurve), NK Zellen mit Interleukinbehandlung (blaue Kurve) und NK Zellen mit Interleukinen und jeweils Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib (grüne Kurve).

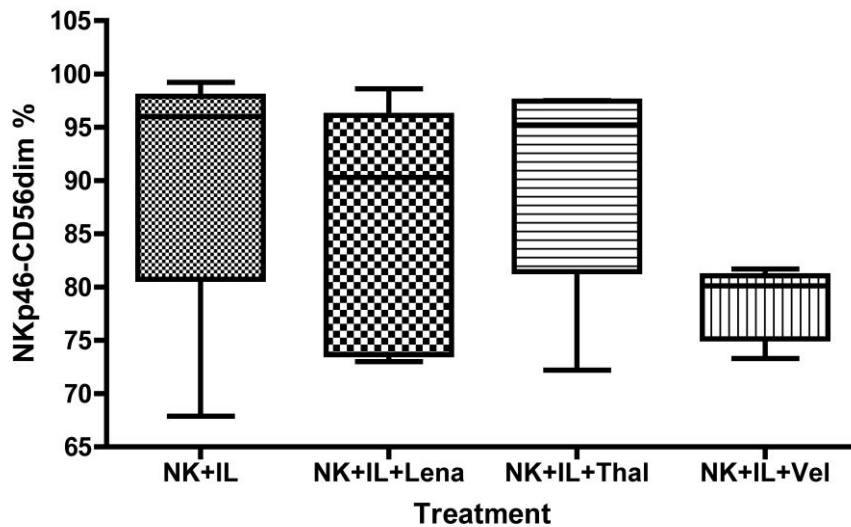


Abb. 38: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp46-Expression bei reifen NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95% Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 96 % (IQR 80,6-97,3), Median Lenalidomid: 90,3 % (IQR 74-96), $p=0,24$, Median Thalidomid: 95,2 % (IQR 81,5-97,4), $p=0,87$, Median Bortezomib 80,1 % (IQR 75-81), $p=0,09$, $n=5$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,01$).

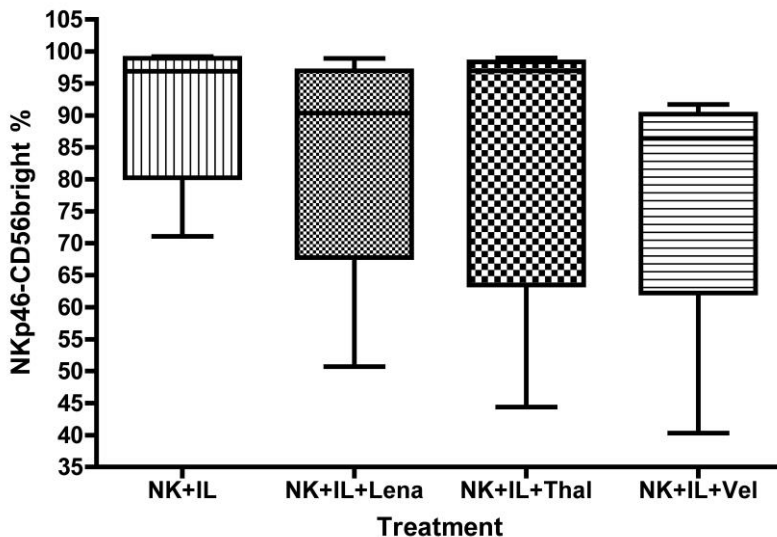


Abb. 39: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp46-Expression bei unreifen NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95% Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 96,9 % (IQR 80,3-98,95), Median Lenalidomid: 90,4 % (IQR 67,8-97), $p=0,47$, Median Thalidomid: 96,95 % (IQR 63,5-98,4), $p=0,6$, Median Bortezomib 85,3 % (IQR 61,3-90), $p=0,37$, $n=5$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,01$).

Abbildungen zum Kapitel 3.3.1

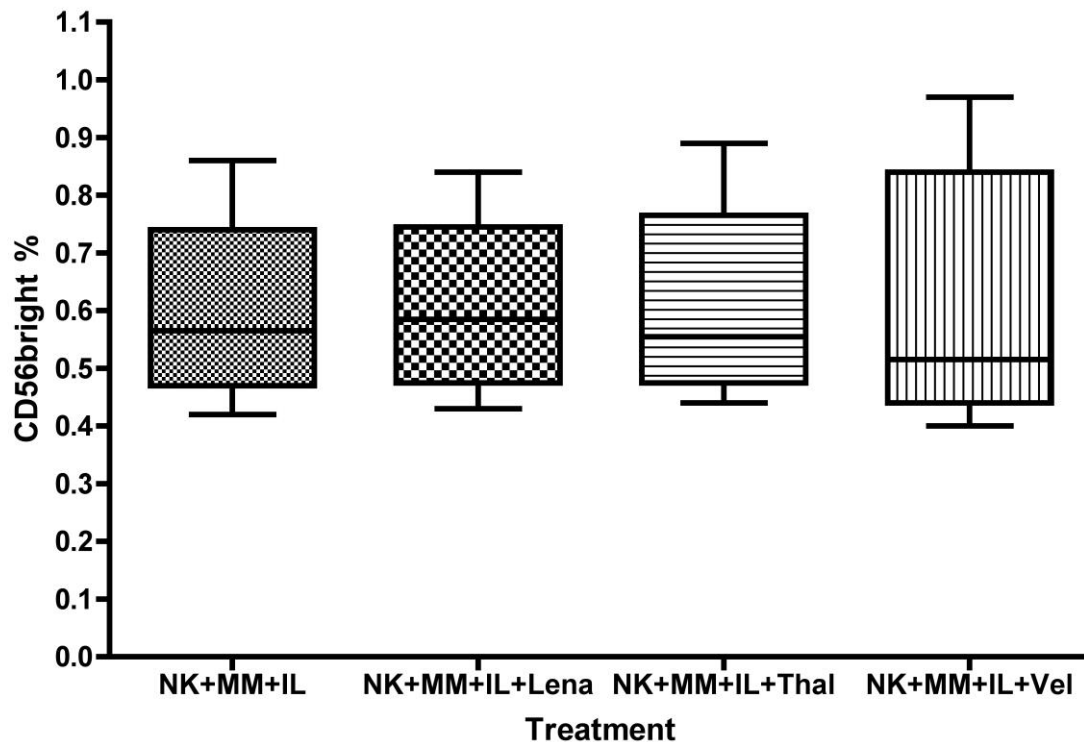


Abb. 40: Durchflusszytometrische Untersuchung der unreifen NK Zellen in Cokultur unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 0,57 % (IQR 0,47-0,74), Median Lenalidomid: 0,59 % (IQR 0,48-0,75), $p=0,58$, Median Thalidomid 0,56 % (IQR 0,48-0,77), $p=0,75$, Median Bortezomib 0,52 % (IQR 0,44-0,84), $p=0,86$, $n=6$, t-Test.

Abbildungen zum Kapitel 3.3.2

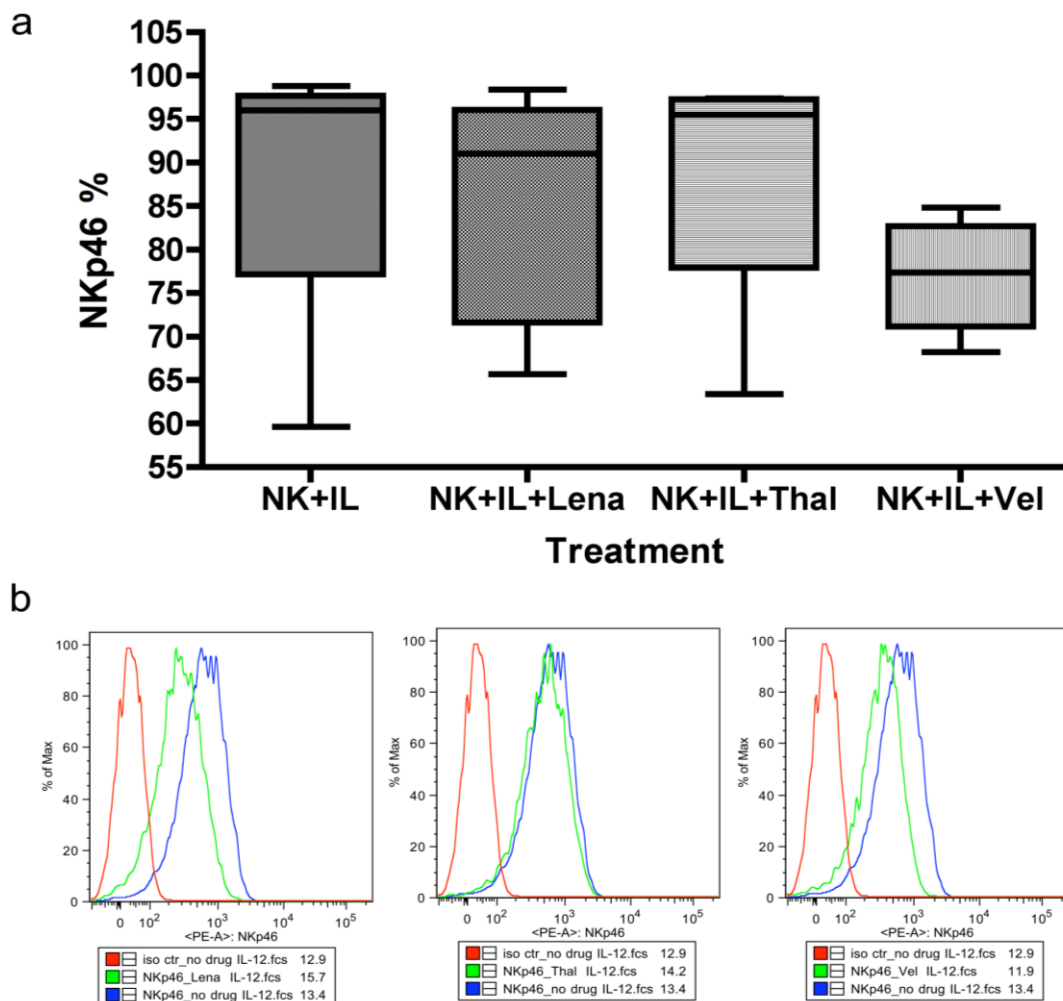


Abb. 41: a) Durchflusszytometrische Untersuchung der NKG2A-Expression bei NK Zellen in Cokultur unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 52,9 % (IQR 40,9-60,15), Median Lenalidomid: 49,10 % (IQR 41,1-53,2), $p=0,16$, Median Thalidomid 51,5 % (IQR 39,5-57,6), $p=0,0374$, Median Bortezomib 50,40 % (IQR 42,1-58,3), $p=0,618$, $n=5$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,0125$).

b) Vergleich von NKG2A-Expressionsdichte als gMFI zwischen NK Zellen in Cokultur mit Interleukinen bzw. NK Zellen in Cokultur mit Interleukinen und den jeweiligen Medikamenten. Median kein Medikament: 398 (IQR 214-595), Median Lenalidomid: 292,7 (IQR 175,8-408), $p=0,097$, Median Thalidomid: 359,6 (IQR 202,8-516,5), $p=0,17$, Median Bortezomib: 346,3 (IQR 202-510), $p=0,198$, $n=4$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,0125$).

c) Exemplarisches Histogramm mit anti-Maus IgG gefärbten NK Zellen als Isotypkontrolle (rote Kurve), NK Zellen mit Interleukinbehandlung (blaue Kurve) und NK Zellen mit Interleukinen und jeweils Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib (grüne Kurve).

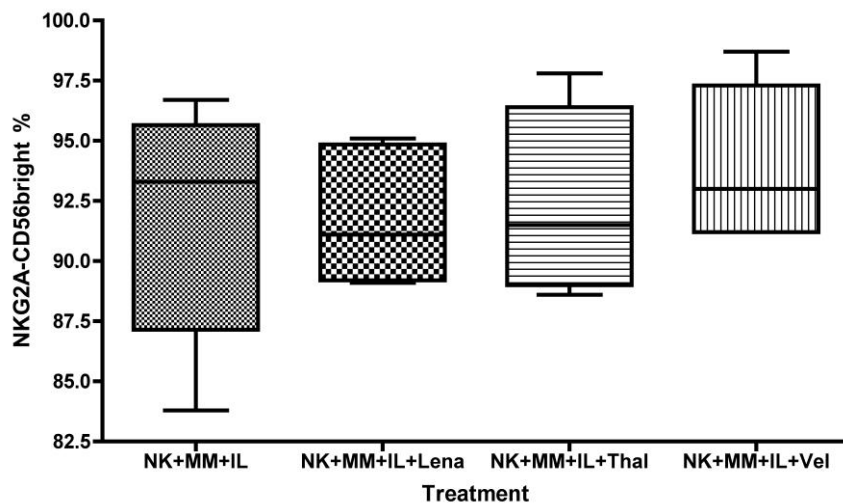


Abb. 42: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKG2A-Expression bei unreifen NK Zellen in Cokultur, dargestellt in Prozent unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 93,3 % (IQR 87,2-95,7), Median Lenalidomid: 91,1 % (IQR 89,2-94,85), $p=0,98$, Median Thalidomid 91,5 % (IQR 89-96,4), $p=0,65$, Median Bortezomib 93 % (IQR 91,2-97,3), $p=0,33$, $n=5$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,0125$).

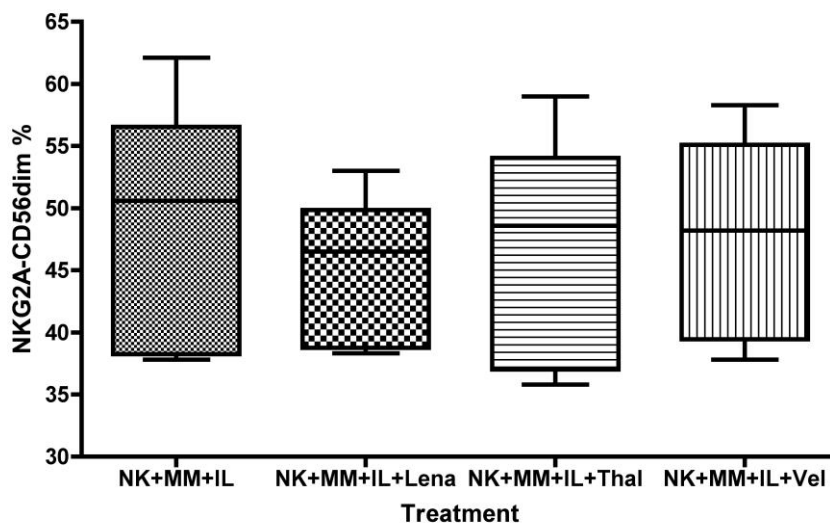


Abb. 43: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKG2A-Expression bei reifen NK Zellen in Cokultur unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 50,6 % (IQR 38,3-56,6), Median Lenalidomid: 46,5 % (IQR 38,8-49,9), $p=0,14$, Median Thalidomid 48,6 % (IQR 37-54,1), $p=0,01$, Median Bortezomib 48,2 % (IQR 39,5-55,1), $p=0,68$, $n=5$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,0125$).

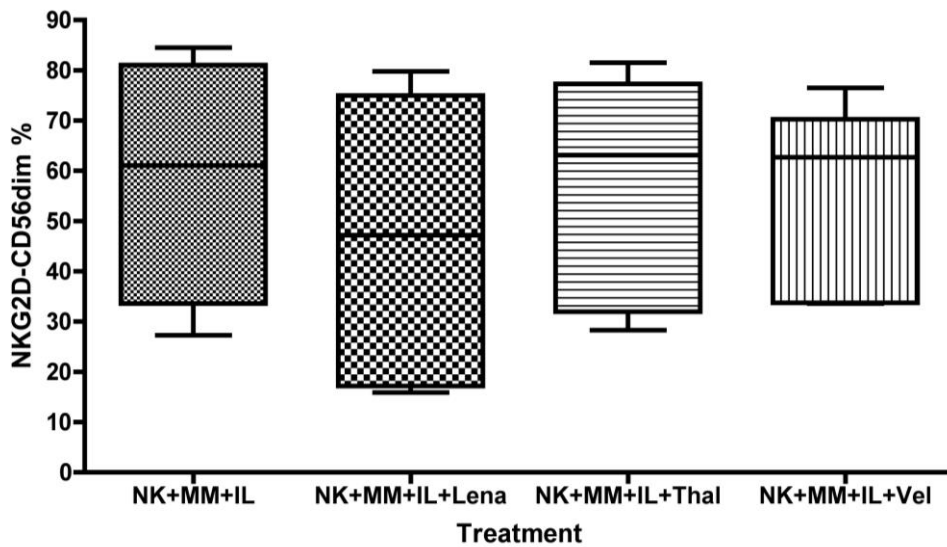


Abb. 44: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKG2D-Expression bei reifen NK Zellen in Cokultur unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 61,1 % (IQR 33,6-81,1), Median Lenalidomid: 47,2 % (IQR 17,2-75), $p=0,026$, Median Thalidomid 63,1 % (IQR 32-77,3), $p=0,27$, Median Bortezomib 62,7 % (IQR 33,8-70,3), $p=0,36$, $n=6$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,0125$).

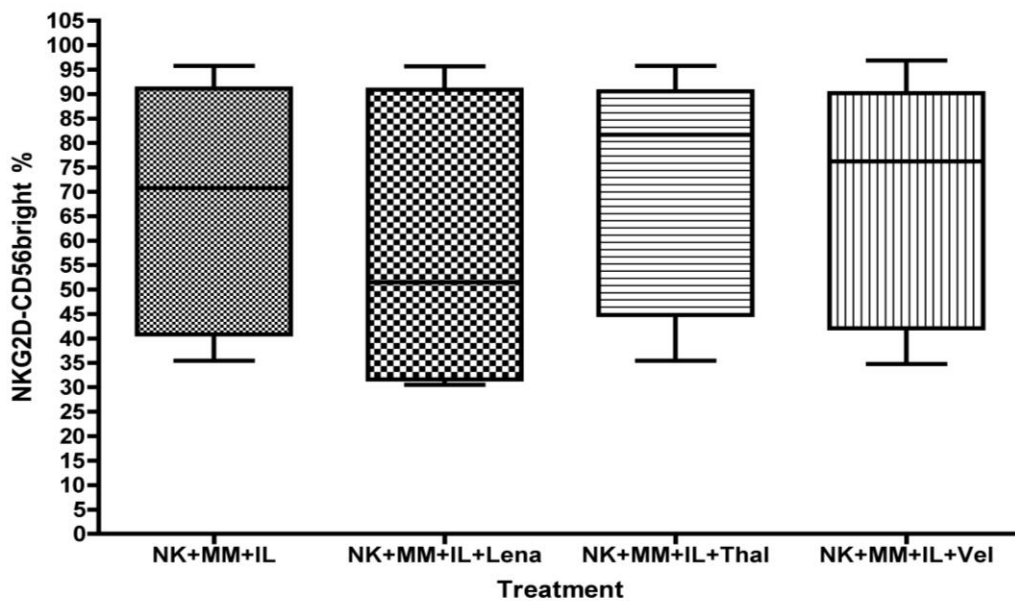


Abb. 45: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKG2D-Expression bei unreifen NK Zellen in Cokultur unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 70,8 % (IQR 40,8-91,2), Median Lenalidomid: 51,45 % (IQR 31,65-90,9), $p=0,09$, Median Thalidomid 81,7 % (IQR 44,8-90,6), $p=0,38$, Median Bortezomib 76,25 % (IQR 42,1-90,2), $p=0,63$, $n=6$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,0125$).

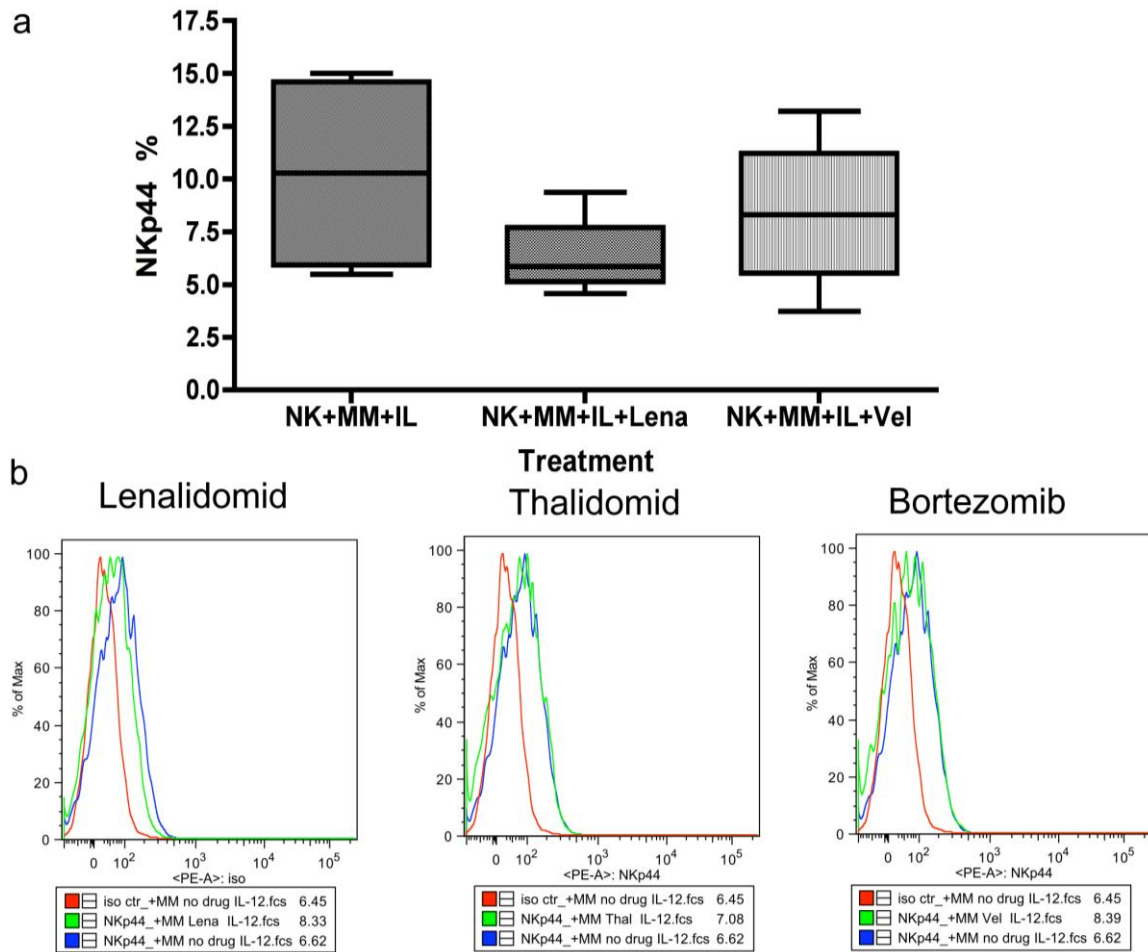


Abb. 46: a) Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp44-Expression bei NK Zellen in Cokultur unter Inkubation mit Lenalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 10,28 (IQR 5,7-14,8) %, Median Lenalidomid: 5,86 (IQR 5-7,6) %, $p=0,133$, Median Bortezomib 8,3 (IQR 5,1-11) %, $p=0,3236$, $n=4$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,0125$).

b) Exemplarisches Histogramm mit anti-Maus IgG gefärbten NK Zellen als Isotypkontrolle (rote Kurve), NK Zellen mit Interleukinbehandlung (blaue Kurve) und NK Zellen mit Interleukinen und jeweils Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib (grüne Kurve).

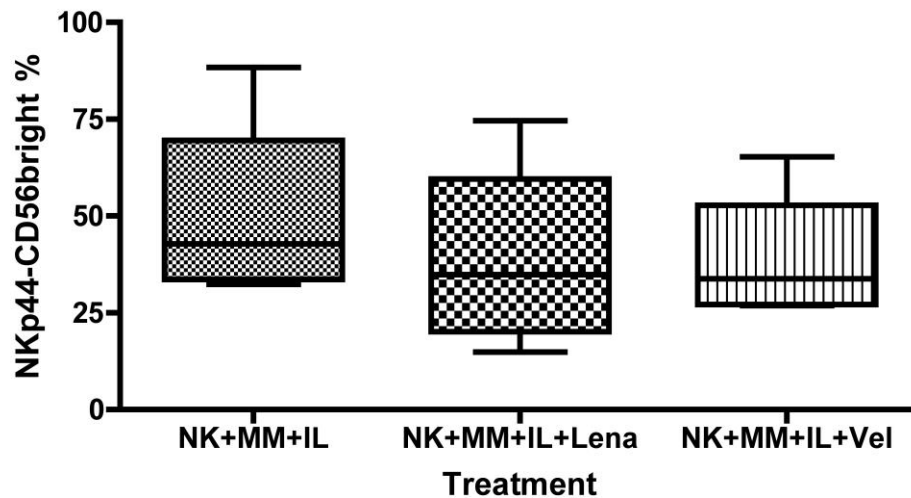


Abb. 47: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp44-Expression bei unreifen Zellen in Cokultur, dargestellt in Prozent unter Inkubation mit Lenalidomid, Bortezomib und ohne Medikament. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95% Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 42,8 (IQR 33,5-70) %, Median Lenalidomid: 34,9 (IQR 20-59) %, $p=0,035$, Median Bortezomib 33,75 (IQR 27-52,5) %, $p=0,06$, $n=4$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,0125$).

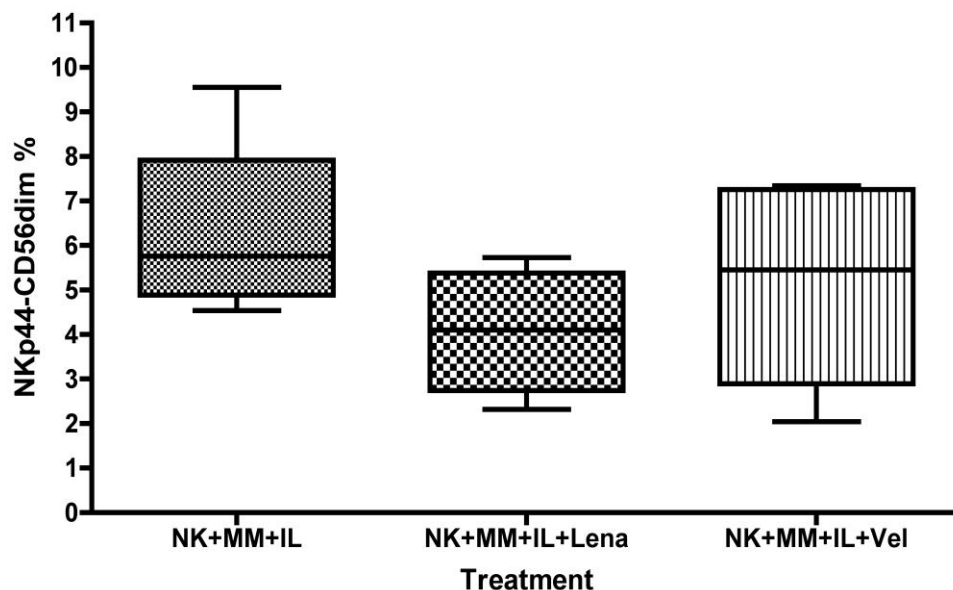


Abb. 48: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp44-Expression bei reifen NK Zellen in Cokultur, dargestellt in Prozent unter Inkubation mit Lenalidomid, Bortezomib und ohne Medikament. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 5,8 % (IQR 4,8-8), Median Lenalidomid: 4,1 % (IQR 2,9-5,2), $p=0,14$, Median Bortezomib 5,45 % (IQR 2,9-7,2), $p=0,5$, $n=4$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,0125$).

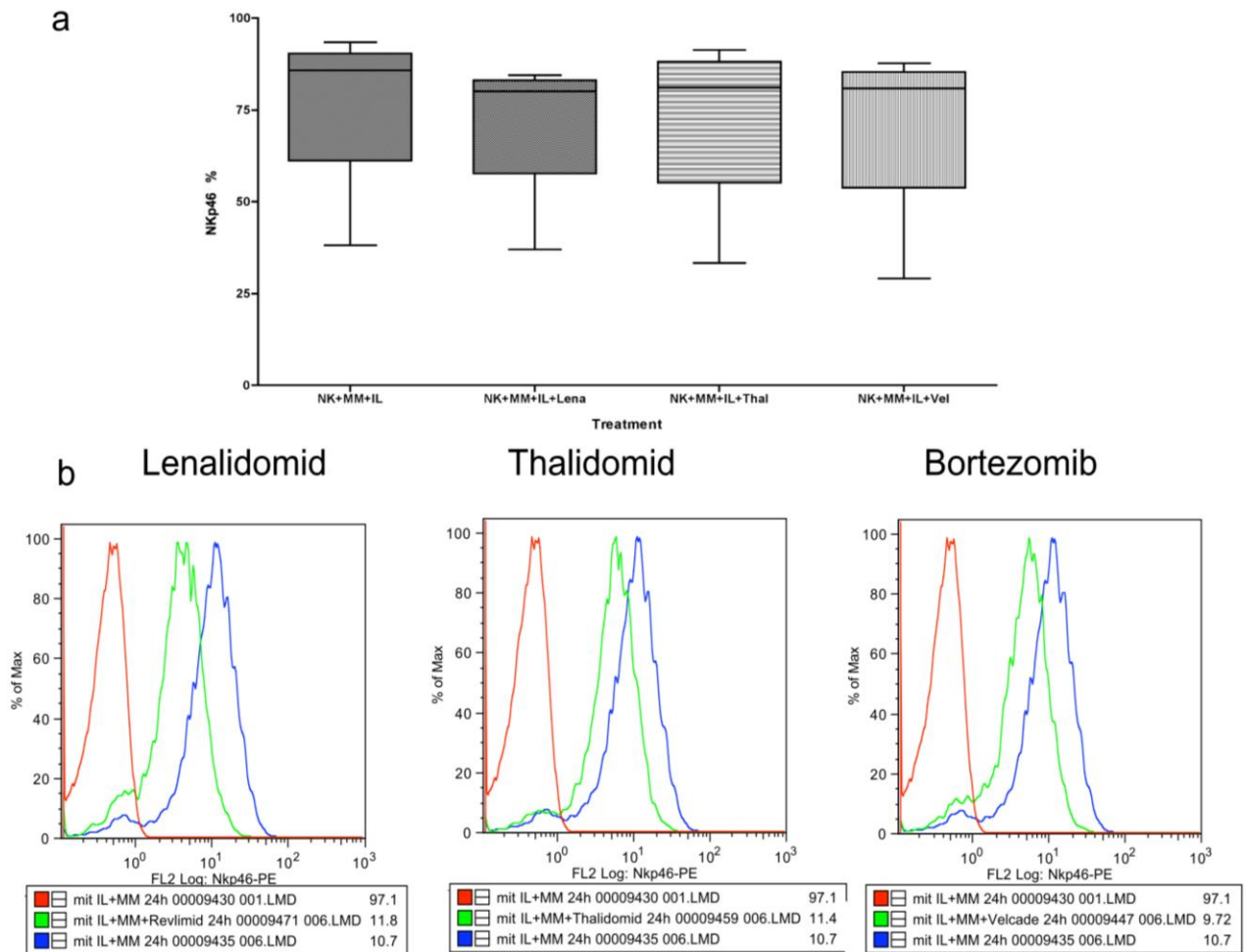


Abb. 49: a) Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp46-Expression bei NK Zellen in Cokultur unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 85,8 % (IQR 61,2-90,5), Median Lenalidomid: 80,05 % (IQR 57,6-83), $p=0,0755$, Median Thalidomid 81,1 % (IQR 55-88), $p=0,0389$, Median Bortezomib 80,85 % (IQR 53-85), $p=0,04$, $n=4$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,0125$).

b) Exemplarisches Histogramm mit anti-Maus IgG gefärbten NK Zellen als Isotypkontrolle (rote Kurve), NK Zellen mit Interleukinbehandlung (blaue Kurve) und NK Zellen mit Interleukinen und jeweils Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib (grüne Kurve).

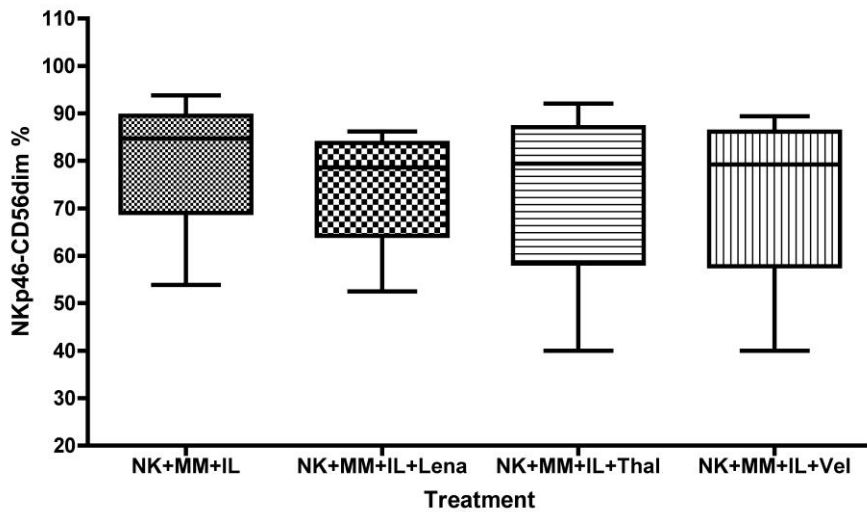


Abb. 50: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp46-Expression bei reifen NK Zellen in Cokultur, dargestellt in Prozent unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 84,7 % (IQR 69-89,5), Median Lenalidomid: 78,65 % (IQR 64-83,9), $p=0,068$, Median Thalidomid 79,45 % (IQR 58,1-87), $p=0,098$, Median Bortezomib 79,25 % (IQR 57,5-86), $p=0,079$, $n=4$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,0125$).

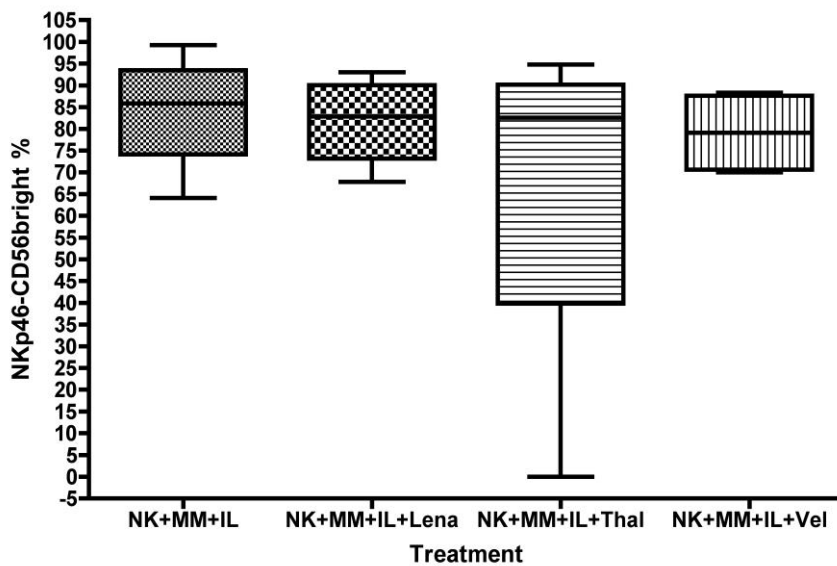


Abb. 51: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp46-Expression bei unreifen NK Zellen in Cokultur, dargestellt in Prozent unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament. Die Linie stellt den Median dar, die Box den Interquartilenabstand, und die Whisker begrenzen das 95 % Konfidenzintervall. Median kein Medikament: 85,9 % (IQR 74,1-93,5), Median Lenalidomid: 82,9 % (IQR 73,1-89,9), $p=0,76$, Median Thalidomid 82,6 % (IQR 40-90), $p=0,3$, Median Bortezomib 79,1 % (IQR 70,5-87,5), $p=0,36$, $n=4$, t-Test, Bonferroni-Korrektur ($p<0,0125$).

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Modell der NK Zellentwicklung.....	10
Abb. 2: Durchflusszytometrische Identifizierung der NK Zellen und der Subpopulationen CD56bright und CD56dim	31
Abb. 3: a) Durchflusszytometrische Untersuchung von NK Zellen, dargestellt als Absolutwerte und Relativwerte von PBMC, dazu Antigenexpression von CD56 als gMFI. Vergleich zwischen NK Zellen allein bzw. Cokultur mit Interleukinen.....	34
Abb. 4: Durchflusszytometrische Untersuchung der reifen und unreifen Subpopulationen unter dem Einfluss der Myelomzelllinie RPMI-8226, dargestellt als Absolutwerte und Relativwerte von PBMC. Vergleich zwischen NK Zellen allein bzw. Cokultur mit Interleukinen.....	35
Abb. 5: Durchflusszytometrische Untersuchung von NKG2D-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen unter dem Einfluss der Myelomzellen RPMI-8226, dargestellt in Prozent (a), dazu die Dichte der Antigenexpression von NKG2D als gMFI (b). Vergleich zwischen NK Zellen alleine bzw. Cokultur mit Interleukinen.....	37
Abb. 6: Durchflusszytometrische Untersuchung von NKG2D-Expression in der reifen NK-Zellpopulation unter dem Einfluss der Myelomzellen RPMI-8226, dargestellt in Prozent und als Histogramm.	38
Abb. 7: Durchflusszytometrische Untersuchung von NKp46-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen (a) und in der reifen NK-Zellpopulation (b) unter dem Einfluss der Myelomzellen RPMI-8226, dargestellt in Prozent und als exemplarisches Histogramm. Vergleich zwischen NK Zellen allein bzw. Cokultur mit Interleukinen.....	39
Abb. 8: IFN-gamma Produktion von NK Zellen in Prozent. Vergleich zwischen NK Zellen allein bzw. Cokultur unter Inkubation mit und ohne Interleukine.	40
Abb. 9: IFN-gamma Produktion von den unreifen NK Zellen in Prozent. Vergleich zwischen NK Zellen allein bzw. Cokultur unter Inkubation mit und ohne Interleukine.....	41
Abb. 10: IFN-gamma Produktion von den reifen NK Zellen in Prozent. Vergleich zwischen NK Zellen allein bzw. Cokultur unter Inkubation mit und ohne Interleukine.....	41
Abb. 11: Einfluss der Medikamente Lenalidomid (Lena), Thalidomid (Thal) und Bortezomib (Vel) auf die NK Zellen dargestellt als Absolutwerte und Relativwerte von PBMC, dazu die Antigenexpression von CD56 als gMFI.....	43
Abb. 12: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKG2D-Expression in der	

Gesamtpopulation der NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent, dazu die Antigenexpression von NKG2D als gMFI.	45
Abb. 13: a) Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp30-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen, dargestellt in Prozent unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament.	47
Abb. 14: Einfluss der Medikamente Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib auf die IFN-gamma Produktion der a) Gesamtpopulation der NK Zellen und der entsprechenden Subpopulationen b) CD56bright und c) CD56dim dargestellt als Prozentwerte.	49
Abb. 15: NK Zellen in Cokultur unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent.	50
Abb. 16: Reife NK Zellen in Cokultur unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent.	51
Abb. 17: a) Durchflusszytometrische Untersuchung der NKG2D-Expression bei NK Zellen in Cokultur unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent.	53
Abb. 18: Einfluss der Medikamente Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib auf die IFN-gamma Produktion der a) gesamten NK Zellen sowie der Subpopulationen b) CD56bright und c) CD56dim in Cokultur, dargestellt als Prozentwerte.	56
Abb. 19: Durchflusszytometrische Untersuchung von NKG2A-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen unter dem Einfluss der Myelomzellen RPMI-8226, dargestellt in Prozent.	80
Abb. 20: Durchflusszytometrische Untersuchung von NKG2A-Expression in der unreifen NK- Zellpopulation unter dem Einfluss der Myelomzellen RPMI-8226, dargestellt in Prozent.	80
Abb. 21: Durchflusszytometrische Untersuchung von NKG2A-Expression in der reifen NK- Zellpopulation unter dem Einfluss der Myelomzellen RPMI-8226, dargestellt in Prozent.	81
Abb. 22: Durchflusszytometrische Untersuchung von NKG2D-Expression in der unreifen NK-Zellpopulation unter dem Einfluss der Myelomzellen RPMI-8226, dargestellt in Prozent.	81
Abb. 23: Durchflusszytometrische Untersuchung von NKp44-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen unter dem Einfluss der Myelomzellen RPMI-8226,	

dargestellt in Prozent.	82
Abb. 24: Durchflusszytometrische Untersuchung von NKp44-Expression in der unreifen NK- Zellpopulation unter dem Einfluss der Myelomzellen RPMI-8226, dargestellt in Prozent.....	82
Abb. 25: Durchflusszytometrische Untersuchung von NKp44-Expression in der reifen NK- Zellpopulation unter dem Einfluss der Myelomzellen RPMI-8226, dargestellt in Prozent...	83
Abb. 26: Durchflusszytometrische Untersuchung von NKp46-Expression in der unreifen NK- Zellpopulation unter dem Einfluss der Myelomzellen RPMI-8226, dargestellt in Prozent.....	83
Abb. 27: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKG2A-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen, dargestellt in Prozent, dazu die Antigenexpression von NKG2A als gMFI unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament.	84
Abb. 28: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKG2A-Expression bei unreifen NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent.	85
Abb. 29: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKG2A-Expression bei reifen NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent.	85
Abb. 30: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKG2D-Expression bei reifen NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent.	86
Abb. 31: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKG2D-Expression bei unreifen NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent.	86
Abb. 32: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp30-Expression bei reifen NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent.	87
Abb. 33: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp30-Expression bei unreifen NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent.	87
Abb. 34: a) Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp44-Expression in der	

Gesamtpopulation der NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent.	88
Abb. 35: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp44-Expression bei unreifen NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent.	89
Abb. 36: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp44-Expression bei reifen NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent.	89
Abb. 37: a) Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp46-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent.	90
Abb. 38: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp46-Expression bei reifen NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent.	91
Abb. 39: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp46-Expression bei unreifen NK Zellen unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent.	91
Abb. 40: Durchflusszytometrische Untersuchung der unreifen NK Zellen in Cokultur unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent.	92
Abb. 41: a) Durchflusszytometrische Untersuchung der NKG2A-Expression bei NK Zellen in Cokultur unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent.	93
Abb. 42: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKG2A-Expression bei unreifen NK Zellen in Cokultur, dargestellt in Prozent unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament.	94
Abb. 43: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKG2A-Expression bei reifen NK Zellen in Cokultur unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent.	94
Abb. 44: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKG2D-Expression bei reifen NK Zellen in Cokultur unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent.	95

Abb. 45: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKG2D-Expression bei unreifen NK Zellen in Cokultur unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent.	95
Abb. 46: a) Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp44-Expression bei NK Zellen in Cokultur unter Inkubation mit Lenalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent.	96
Abb. 47: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp44-Expression bei unreifen Zellen in Cokultur, dargestellt in Prozent unter Inkubation mit Lenalidomid, Bortezomib und ohne Medikament.....	97
Abb. 48: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp44-Expression bei reifen NK Zellen in Cokultur, dargestellt in Prozent unter Inkubation mit Lenalidomid, Bortezomib und ohne Medikament.....	97
Abb. 49: a) Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp46-Expression bei NK Zellen in Cokultur unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament, dargestellt in Prozent.	98
Abb. 50: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp46-Expression bei reifen NK Zellen in Cokultur, dargestellt in Prozent unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament.....	99
Abb. 51: Durchflusszytometrische Untersuchung der NKp46-Expression bei unreifen NK Zellen in Cokultur, dargestellt in Prozent unter Inkubation mit Lenalidomid, Thalidomid, Bortezomib und ohne Medikament.....	99

9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Crab-Kriterien	14
Tab. 2: Geräte.....	22
Tab. 3: Verbrauchsmaterialien	23
Tab. 4: Zellkultur	24
Tab. 5: Antikörper für Durchflusszytometrie	25
Tab. 6: Reagenzien, Puffer	26
Tab. 7: Wirkung von Myelomzellen auf die NKG2A-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen und in der reifen sowie unreifen Subpopulation.	36
Tab. 8: Wirkung von Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib auf die NKG2A-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen und in der reifen sowie unreifen Subpopulation...44	44
Tab. 9: Wirkung von Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib auf die NKp44-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen und in der reifen sowie unreifen Subpopulation...48	48
Tab. 10: Wirkung von Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib auf die NKp46-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen und in der reifen sowie unreifen Subpopulation...48	48
Tab. 11: Wirkung von Lenalidomid und Bortezomib auf die NKp44-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen und in der reifen sowie unreifen Subpopulation in der Cokultur mit Myelomzellen.	54
Tab. 12: Wirkung von Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib auf die NKp46-Expression in der Gesamtpopulation der NK Zellen und in der reifen sowie unreifen Subpopulation in der Cokultur mit Myelomzellen.	54

10. Danksagung

Als erstes möchte ich ganz besonders Prof. Dr. Marie von Lilienfeld-Toal herzlichst danken. Ich bedanke mich für die Bereitstellung des Themas, die exzellente Betreuung und dein konstruktives und unermüdliches Engagement, liebe Marie, sowie die vielen Tipps, Ideen und Anregungen während der Betreuungszeit. Danke für die Möglichkeit, wissenschaftliches Arbeiten erlernen zu dürfen, für die hundertprozentige Unterstützung und für deine unermüdliche Motivation und Geduld.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Peter Brossart für sein großes Vertrauen in meine Arbeit, für seine Unterstützung und Motivation, an vielen Fortbildungen teilnehmen zu können, und für die Möglichkeit, in seinem Labor arbeiten zu dürfen.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt Annette Busch, Steffanie Held und Solveig Daecker für die labortechnische Einweisung, die vielen Tipps und Tricks im Labor sowie für die tolle Unterstützung bei den Versuchen. Ihre konstruktive Kritik hat zum Gelingen der Arbeit enorm beigetragen.

Steve Silva-Taube danke ich ganz besonders für die mathematische Unterstützung sowie für die tiefen Einblicke in die bizarre Welt der Statistik und für deine tolle Freundschaft. Vielen Dank, dass du immer für mich mit Rat und Tat da warst.

Meinen lieben Freunden Christina Schäfer, Eduard Renz, Janna Kazim und Vildan Uc gilt mein großer Dank vor allem für die deutliche Verbesserung der literarischen Qualität dieser Arbeit. Danke für eure Unterstützung, Aufmerksamkeit und für eure Zeit!

Ganz besonders danke ich meiner geliebten Familie, insbesondere meiner Mama, für ihre bedingungslose Liebe, ihre großartige Unterstützung in allen Lebenslagen und ihre Motivation. Meinem Bruder Eduard Renz sowie meinem Vater Artur Renz danke ich außerdem noch für die Vermittlung ihres technischen Wissens und ihre professionelle Rundumversorgung in Sachen PC. Auch meinen Schwiegereltern danke ich ganz herzlich für ihre tatkräftige und unermüdliche Unterstützung auf vielen Ebenen, nicht nur während der Promotion.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Ehemann Artur Maurer und meinen Kindern Sophia und Konstantin für ihre Liebe, ihre Unterstützung in allen Lebenslagen und für all die glücklichen Momente in meinem Leben.